

**Universidad Autónoma de Madrid  
Departamento de Bioquímica**

**RELACIÓN FUNCIONAL ENTRE LA  
SINTASA DE ÓXIDO NÍTRICO  
ENDOTELIAL Y LA  
METALOPROTEINASA DE MATRIZ DE  
MEMBRANA MT1-MMP DURANTE LA  
MIGRACIÓN DE LA CÉLULA  
ENDOTELIAL**

**Laura Genís Martín**

**Madrid, 2007**

**Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid**

**RELACIÓN FUNCIONAL ENTRE LA  
SINTASA DE ÓXIDO NÍTRICO  
ENDOTELIAL Y LA  
METALOPROTEINASA DE MATRIZ DE  
MEMBRANA MT1-MMP DURANTE LA  
MIGRACIÓN DE LA CÉLULA  
ENDOTELIAL**

**Laura Genís Martín  
Lda. en Ciencias Biológicas**

**Trabajo realizado bajo la dirección de la  
Dra. Alicia G. Arroyo  
Hospital Universitario de la Princesa y  
Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, CNIC  
Madrid, 2007**

## AGRADECIMIENTOS

Más de una vez me he sorprendido pensando en cómo daría las gracias a tantas gentes cuando escribiera mi tesis y ahora, cuando ya he terminado de escribir todo lo demás, me doy cuenta de que esta es la parte más difícil. No puedo pensar en un primero ni un último, porque la verdad es que cada uno me ha apoyado de forma diferente y me ha aportado cosas igualmente valiosas. Y es que tengo tantas cosas que agradecer!!!

Empezaré dando las gracias a mi directora de tesis, Alicia, por haberme dado la oportunidad de descubrir la ciencia e inyectarme enormes dosis de entusiasmo.

A mis primeros compis de labo, Patri, Bego, David, Emma, Carlitos, Ana, Sebas, M<sup>a</sup> Carmen, Eli, Maru, Régula, y André por tantos buenos ratos de ciencia y sobre todo de cafés de sobremesa y Narizotas.

Gracias a mis eternos amigos, Susi, Raúl, Aitor, Raquel, Patricia, Luife, Ana, Javi y Diana, que siguen aguantando con estoica paciencia mis mil y una batallitas... pobres, y lo que les queda! Miles de gracias chicos!

Gracias también a mis compis de la Princesa, por aquel año entrañable “entre vinos y torreznos”...

A mi *audiovisual producer* favorito, mi técnico de *Powerpoint*, mi escocés almeriense, Dani, mi Dani, no puedo agradecerte más aún, ya lo sabes, me has salvado la vida de tantas maneras...

Gracias por escuchar siempre mis problemas experimentales e idiomáticos, por acompañarme tantas veces al labo los fines de semana...

A mi “*baby Matthew*”, que de momento, comparte conmigo todo lo que escribo... y todo lo demás.

Gracias a mi perrilla Lía, quién más me ha acompañado durante la escritura, por toda su paciencia, aún sin entender que habrá tan importante en el ordenador que me impide jugar con ella, y por avisarme, siempre tan dulce como es ella, de cuando ya es hora de parar para despejarse con un paseo. A estas alturas debe ser la perra más experta en MT1!

A mis compis de labo, Bea, Salomón, Pilarín, Angelita, Antoñito, Vane, Victoria, Ara, Iñigo, Ana, Marta, Raffaele, Nazilla, Olivia, Sara, Asier, Dolo, Enara, Patricia y Esther. Por...tantas cosas, chicos! Por aguantar mis charletas sobre el orden, por esos diez minutillos al sol de sobremesa, por esas barbacoas ibéricas, por las HUVEC y por las MLEC!

Gracias también a toda la gente del CNIC, las chicas de compras, los informáticos, etc, que me han echado una mano en mil y una cosillas.

Gracias a mis padres y mi hermana, por las miles de horas de su paciencia, por escuchar siempre mis conflictos, por darme ánimos cuando lo he necesitado, por tantas noches de charla en el jardín...

A mi padre, por el coaching...

A mis tios y primos, que están siempre pendientes de cómo va mi tesis, y escuchan con tanta paciencia mis batallitas con los experimentos.

A mi hada madrina, mi Pepito grillo, por enseñarme... la vida. Tantas cosas importantes, además de esta tesis, han sido posibles gracias a ti! A pesar de tanto tiempo aún hay muchas cosas que nunca te digo... pero eso tú ya lo sabes!

Gracias a Alicia “de la biblio”, por esas buenas charlas con café.

A todos los que siempre me dicen “¿Y sobre qué investigas?” y luego se me quedan con esas caritas de pocker... Gracias por escuchar con tanto interés mis diez minutos de explicación, no os preocupeis, a mi me ha llevado años entenderlo...

Bueno, pues aquí termino, por si me estoy olvidando de alguien, gracias a ti también!

Un besote,

Laura.



## RESUMEN

El NO es imprescindible para el mantenimiento de la homeostasis vascular y además es un regulador importante de la angiogénesis. Sin embargo, los mecanismos por los que modula este proceso aún se desconocen. Hemos estudiado la posible relación funcional entre el NO y la metaloproteinasa de matriz de membrana 1 (MT1-MMP) durante la migración endotelial y la formación de tubos capilares. La sintasa endotelial de NO (eNOS) y MT1-MMP colocalizan en protrusiones de membrana asociadas a la motilidad celular en células endoteliales humanas (ECs). Además, el NO se produce en estas mismas estructuras de membrana y se libera al medio durante la migración endotelial. Por un lado, hemos analizado la regulación de MT1-MMP por el NO en ECs durante la migración, y por otro lado, hemos demostrado el requerimiento de MT1-MMP para la migración y la formación de tubos inducidas por el NO. El NO aumenta tanto la acumulación de MT1-MMP en la membrana de ECs durante la migración como la degradación de colágeno tipo I por estas células. Las ECs de pulmón de ratones deficientes en eNOS presentan una expresión y localización en membrana de MT1-MMP alterada y una migración y formación de tubos *in vitro* deficientes. Por último, el bloqueo de MT1-MMP con anticuerpos también disminuye la migración y formación de tubos inducidos por el NO en ECs humanas; este mismo efecto ocurre durante la migración y formación de tubos inducidos por el NO con ECs de pulmón de ratones deficientes en MT1-MMP. De esta manera, identificamos a MT1-MMP como una diana molecular del NO durante la migración endotelial y la angiogénesis.

## ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is essential for vascular homeostasis and is also a critical modulator of angiogenesis; however, the molecular mechanisms of NO action during angiogenesis remain elusive. We have investigated the potential relationship between NO and membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) during endothelial migration and capillary tube formation. Endothelial NO synthase (eNOS) colocalizes with MT1-MMP at motility-associated protrusions in migratory human endothelial cells (ECs); moreover, NO is produced at these structures and is released into the medium during EC migration. We have therefore addressed two questions: 1) the putative regulation of MT1-MMP by NO in migratory ECs; and 2) the requirement for MT1-MMP in NO-induced EC migration and tube formation. NO upregulates MT1-MMP membrane clustering on migratory human ECs, and this is accompanied by increased degradation of type I collagen substrate. MT1-MMP membrane expression and localization are impaired in lung ECs from eNOS-deficient mice, and these cells also show impaired migration and tube formation *in vitro*. Inhibition of MT1-MMP with a neutralizing antibody impairs NO-induced tube formation by human ECs, and NO-induced endothelial migration and tube formation are impaired in lung ECs from mice deficient in MT1-MMP. MT1-MMP thus appears to be a key molecular effector of NO during EC migration and angiogenesis.

# ÍNDICE

	Pags
Subíndice de figuras-----	7
Abreviaturas-----	8
Introducción-----	10
El óxido nítrico -----	10
1. Bioquímica del óxido nítrico -----	10
2. Las sintasas de óxido nítrico -----	11
3. La sintasa de óxido nítrico endotelial -----	13
3.1 Regulación de eNOS -----	13
3.1.1 Regulación transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona ---	13
3.1.2 Interacción con otras moléculas -----	14
3.2 Funciones del óxido nítrico endotelial -----	15
Las metaloproteinasas de matriz -----	16
1. Clasificación de las metaloproteinasas de matriz ----	16
2. Regulación de las metaloproteinasas de matriz -----	18
2.1 Regulación transcripcional -----	18
2.2 Regulación post-transcripcional -----	18
2.3 Activación -----	19
2.4 Inhibidores endógenos -----	19
2.5 Otros mecanismos de regulación.	
Asociaciones proteicas -----	19
3. Actividad de las metaloproteinasas de matriz -----	20
4. Funciones de las metaloproteinasas de matriz -----	20
MT1-MMP -----	21
1. Dominios de MT1-MMP -----	21
2. Regulación de la actividad de MT1-MMP -----	22
2.1 Transcripción -----	22
2.2 Maduración y mecanismos proteolíticos-----	22
2.3 Inhibición-----	23
2.4 Localización en la superficie celular.	
Interacciones proteicas-----	23
2.5 Tráfico y compartimentalización-----	23
2.6 Dimerización-----	24
2.7 Otros mecanismos-----	24
3. Actividad de MT1-MMP-----	25
3.1 Degradación de colágeno-----	25
3.2 Procesamiento de otras moléculas-----	25
4. Funciones de MT1-MMP-----	26
4.1 Migración e invasión celular-----	26
4.2 Angiogénesis-----	26
4.3 Tumorigénesis-----	27
4.4 Otras funciones-----	27
Objetivos -----	29
Materiales y métodos -----	30
Resultados -----	37
1. Implicación de MT1-MMP en la formación de angiotubos por ECs inducida por factores angiogénicos <i>in vitro</i> -----	37
2. Regulación de MT1-MMP por el NO en células	

endoteliales-----	40
2.1 Regulación de MT1-MMP por el óxido nítrico en células endoteliales humanas-----	40
2.1.1 Localización subcelular de MT1-MMP eNOS y el NO-----	40
2.1.2. Regulación de la distribución subcelular y actividad de MT1-MMP-----	46
2.2 Regulación de MT1-MMP en ausencia de NO en ECs murinas-----	55
2.2.1 Regulación de la expresión, localización y actividad de MT1-MMP en ausencia de NO-----	55
2.2.2. Función de MT1-MMP en la migración endotelial y formación de angiotubos en ausencia de NO-----	62
3. Relación funcional entre MT1-MMP y el NO durante la angiogénesis-----	65
3.1 Implicación de MT1-MMP en la migración y formación de tubos inducidas por el NO-----	65
Discusión -----	74
Conclusiones -----	85
Bibliografía -----	86
Lista de publicaciones -----	107

***Subíndice de figuras*****Pags**

Figura 1 -----	10
Figura 2 -----	11
Figura 3 -----	12
Figura 4 -----	17
Figura 5 -----	21
Figura 6 -----	22
Figura 7 -----	39
Figura 8 -----	42
Figura 9 -----	45
Figura 10 -----	48
Figura 11 -----	49
Figura 12 -----	50
Figura 13 -----	52
Figura 14 -----	54
Figura 15 -----	56
Figura 16 -----	58
Figura 17 -----	61
Figura 18 -----	64
Figura 19 -----	66
Figura 20 -----	67
Figura 21-----	68
Figura 22-----	70
Figura 23-----	72
Esquema 1-----	84

## ABREVIATURAS

Ab.....	anticuerpo
BRAD.....	bradikina
Ca <sup>2+</sup> .....	calcio
CaM.....	calmodulina
Cav-1.....	caveolina-1
CXCL8/ IL8.....	interleukina 8
CXCL9/MIG.....	quimioquina mig
COL I.....	colágeno tipo I
Cy3.....	cianina 3
DAF-FM.....	diaminofluoresceína-FM
DEA-NONOato.....	sal de 2-(n;Ndiethylamino)-diazolato-2-oxido diethylammonio
DETA-NONOato.....	sal de (Z)-1-[2-(2-aminoethyl)amino]diazon-1-ium-1,2-diolato
ECs.....	células endoteliales
ECM.....	matriz extracelular
EDRF.....	factor relajante derivado de endotelio
EGF.....	factor de crecimiento epidérmico
EMMPRIN.....	inductor extracelular de metaloproteinasas de matriz
eNOS.....	sintasa endotelial de óxido nítrico
FITC.....	isotiocianato de fluoresceína
FN.....	fibronectina
FG.....	fibrinógeno
FGF.....	factor de crecimiento de fibroblastos
GEL.....	gelatina
HBSS.....	solución salina Hank
HUVEC.....	células endoteliales humanas de vena umbilical
IL-1.....	interleucina-1
kD.....	kilodalton
KO.....	deficiente en ( <i>knock out</i> )
L-NAME.....	L-nitroarginina metil ester
LPS.....	lipopolisacárido
LPR.....	receptor de lipoproteínas de baja densidad
mAb.....	anticuerpo monoclonal
MCP-1.....	proteína quimioatrayente de monocitos-1
MFI.....	intensidad media de fluorescencia
MLEC.....	células endoteliales de pulmón de ratón
MMP.....	metaloproteinasa de membrana
MT1-MMP.....	metaloproteasa de matriz de membrana 1
MTCBP-1.....	proteína de unión citoplásmica a MT1-MMP -1
MUC-1.....	mucina 1
Neg.....	negativo
NO.....	óxido nítrico
NOS.....	sintasas de óxido nítrico
NOSIP.....	proteína de interacción con eNOS
NOSTRIN.....	proteína inductora del tráfico de eNOS
NSF.....	factor sensible a N-etilmaleimida
pAb.....	anticuerpo policlonal
PAGE.....	electroforesis en gel poliacrilamida
PBS.....	tampón fosfato salino

PDGF.....factor de crecimiento derivado de plaquetas  
 PMA ..... éster de forbol (*phorbol 12-myristate 13-acetate*)  
 SC.....subconfluencia  
 S.D.....desviación estándar  
 SDF-1/ CXCL12 .....factor derivado de células estromales-1  
 SNAP.....S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina  
 SNARE.....proteína receptora de unión a NSF soluble  
 TBS..... tampón tris cloruro sódico  
 TGFβ .....factor de crecimiento transformante-β  
 tTG .....transglutaminasa tisular  
 VEGF.....factor de crecimiento de endotelio vascular  
 WH ..... cicatrización de herida (*wound-healing*)  
 WT.....fenotipo salvaje (*wild type*)

# INTRODUCCIÓN

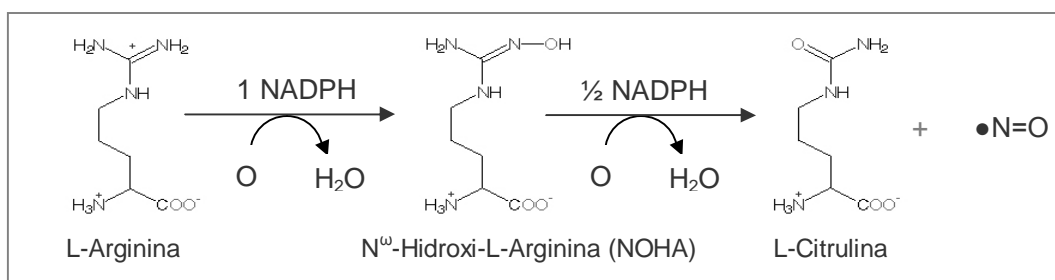
## EL ÓXIDO NÍTRICO

A principios de los años 80 Furchgott y Zawadzky describieron que la relajación de los vasos sanguíneos era dependiente del endotelio vascular. Estudios posteriores revelaron la existencia de un factor que era liberado en respuesta a distintos estímulos vasorelajantes como la histamina o la bradikinina; este factor se denominó factor relajante derivado de endotelio, EDRF (*endothelium-derived relaxing factor*). Varios años después diferentes autores propusieron y demostraron que la naturaleza de este EDRF era el óxido nítrico (NO) (Palmer *et al.*, 1987), (Radomski *et al.*, 1987), (Ignarro *et al.*, 1988), (Furchgott, 1999).

El NO es un radical libre gaseoso poco soluble en agua, inestable, que presenta una gran avidez de reacción con otras moléculas y tiene una vida media y un rango de actividad muy cortos. Actúa como mensajero intercelular en diversos tejidos y presenta gran variedad de funciones fisiológicas como modulación del tono vascular, inhibición de la agregación plaquetaria, regulación de la adhesión leucocitaria al endotelio vascular, inhibición de la oxidación de lípidos, neurotransmisión en los sistemas nerviosos central y periférico, regulación de la apoptosis, activación de la citotoxicidad macrofágica y a su vez supone una defensa natural del sistema inmune (Feron and Balligand, 2006), (Moncada and Higgs, 2006), (Lowenstein, 2007).

## 1. BIOQUÍMICA DEL ÓXIDO NÍTRICO

En los años 80 se describió la producción de NO en células endoteliales, y se identificó en el sistema nervioso central la sintasa responsable de convertir L-Arginina en NO y L-Citrulina (Palmer *et al.*, 1988)



**Figura 1.** Conversión de L-Arginina a NO y L-Citrulina.

Estas sintasas (NOS) catalizan la oxidación de la L-Arginina hasta producir NO y L-Citrulina con ayuda de distintos cosustratos como donadores de electrones ( $e^-$ ) (el oxígeno ( $O_2$ ) y NADPH) y cofactores como FAD, FMN, la tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ), el grupo hemo, el calcio ( $Ca^{2+}$ ) y la calmodulina (CaM). En primer lugar, la L-Arginina es hidroxilada en un grupo guanidinio terminal generando N-hidroxi-L-Arginina (NOHA), que es posteriormente oxidada hasta formar NO y L-Citrulina (Figura 1).

## 2. LAS SINTASAS DE NO: ESTRUCTURA Y DOMINIOS

Las NOS son enzimas homodiméricas capaces de producir NO a partir de L-Arginina. Existen tres isoformas de la NOS en mamíferos, la sintasa de NO neuronal, nNOS (NOS tipo I o NOS1), la sintasa de NO inducible, iNOS (NOS tipo II o NOS2) y la sintasa de NO endotelial, eNOS (NOS tipo III o NOS3). Posteriormente se han descrito proteínas homólogas en otros vertebrados como aves, peces o anfibios y en invertebrados como insectos, moluscos y corales.

Los genes de las distintas NOS presentan una estructura genómica similar, indicando que estos genes han evolucionado de un gen ancestral común. Las NOS se han clasificado en función de sus distintas características: enzimas constitutivas e inducibles o dependientes e independientes de  $Ca^{2+}$  (nNOS y eNOS *versus* iNOS) y de citosol o de membrana (nNOS, iNOS *versus* eNOS); aunque actualmente estas nomenclaturas se mantienen, las clasificaciones no son del todo rigurosas ya que estas enzimas no se ajustan estrictamente a las características de cada grupo.

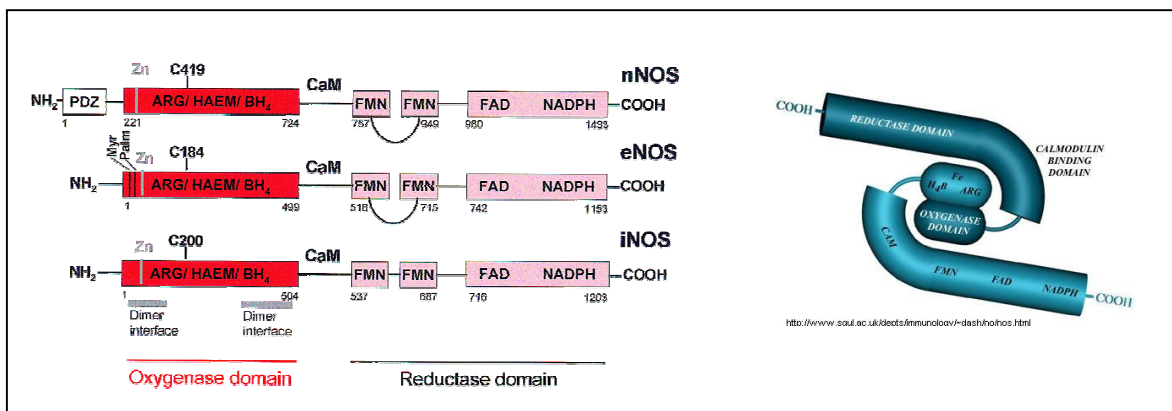
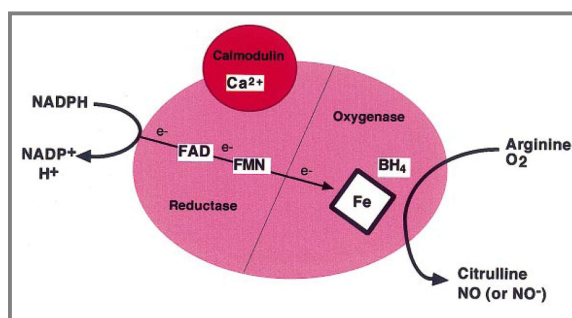


Figura 2. Dominios y estructura de las NOS. Adaptado de Alderton *et al.* 2001.



Las NOS se componen de dos dominios principales, un **dominio reductasa** y un **dominio oxigenasa** separados por un sitio de unión a la CaM (Figura 2).

El **dominio reductasa** se localiza en la parte C-terminal de la proteína y presenta los sitios de unión para los cofactores FAD, FMN y el cosustrato NADPH. Este dominio presenta una gran homología con la citocromo P-450 reductasa. En el seno de este dominio es donde comienza la transferencia de electrones ( $e^-$ ) desde el donador NADPH, a través de las flavinas FAD y FMN hasta el grupo hemo, situado en el dominio oxigenasa. Esta transferencia de electrones se produce desde el dominio reductasa de un monómero hasta el grupo hemo del dominio oxigenasa del otro monómero (Figura 3). Sin embargo, la oxidación del NADPH no requiere la formación de dímeros.



**Figura 3.** Producción de NO por las NOS. Adaptado de Alderton *et al.* 2001

El **dominio oxigenasa** está situado en la parte N-terminal de la proteína, contiene sitios de unión para el grupo hemo, BH4 y el sustrato, L-Arginina. En este dominio se produce la hidroxilación de la L-Arginina a NOHA y la consiguiente conversión de ésta a NO y L-Citrulina. Estas reacciones ocurren una vez se ha formado el dímero. El **grupo hemo** es esencial para la formación del dímero y supone el punto de interacción entre el dominio reductasa y el dominio oxigenasa. Este grupo cataliza la oxidación del sustrato, L-Arginina hasta producir NO y L-Citrulina. El **cofactor BH4** se une al dominio oxigenasa, estabilizando los dímeros. Se localiza en la interfase entre los dos monómeros, donde interacciona con el grupo hemo, donando un electrón. La L-Arginina se une a un grupo guanidinio presente cerca del grupo hemo. La unión de la L-Arginina estabiliza el dímero, aumenta la afinidad de las NOS por la BH4 y aumenta el potencial de reducción del grupo hemo, favoreciendo así la reacción. El **dominio de unión a  $Ca^{2+}$ /CaM**, situado entre los dos dominios principales de la proteína, presenta un papel esencial en la estructura y función de las NOS. La CaM puede unirse de forma reversible (nNOS y eNOS), o de forma irreversible (iNOS), que de esta manera es capaz de activarse a muy bajas concentraciones de  $Ca^{2+}$ . nNOS y eNOS presentan un grupo de 40-50

aminoácidos dentro del sitio de unión a FMN, conocido como **dominio autoinhibidor**, ya que desestabiliza la unión de la CaM.

### 3. LA SINTASA DE NO ENDOTELIAL (eNOS)

eNOS se expresa en el endotelio vascular, el epitelio de las vías respiratorias y otros tipos celulares. La falta de disponibilidad de NO contribuye a producir hipertensión pulmonar y sistémica, aterosclerosis y disfunción de las vías respiratorias. eNOS es la única de las NOS que es miristoilada y palmitoilada, modificaciones que contribuyen a su localización en caveolas y membranas del Golgi (Shaul *et al.*, 1996), (Liu *et al.*, 1997).

#### 3.1 REGULACIÓN DE eNOS

La vida media corta del NO y su variedad de dianas biológicas hacen necesaria una regulación espacial y temporal rigurosa de la síntesis de NO, lo cual se refleja en la complicada maquinaria de regulación existente para eNOS.

##### 3.1.1 Regulación transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona

El promotor de eNOS presenta dos regiones reguladoras positivas principales, PDR I y PDRII, implicadas en la **transcripción** basal de eNOS. Éstas, presentan secuencias de unión a factores de transcripción como Sp1 y Sp3 y Ets, Elf-1, YY1 y una proteína asociada a Myc, respectivamente. Además, este promotor está regulado por múltiples interacciones de estos factores en *cis* y *trans*. Diversos estímulos regulan la expresión de eNOS a nivel **post-transcripcional**, modulando los niveles de su mRNA, ya sea positivamente como TGF- $\beta$  (Inoue *et al.*, 1995), CsA (Lopez-Ongil *et al.*, 1996), lysoPC (Zembowicz *et al.*, 1995) o el crecimiento celular (Arnal *et al.*, 1994), o negativamente como TNF- $\alpha$  (Yoshizumi *et al.*, 1993), (Anderson *et al.*, 2004) o LPS (Arriero *et al.*, 2002) entre otros. La regulación a nivel **post-traducciona** incluye la unión reversible a  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM, que depende de los niveles celulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , modulados por distintos agonistas. La CaM es un importante regulador de la actividad, ya que la unión de  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM aumenta la tasa de transferencia de electrones desde el NADPH a través de las flavinas y también induce esta transferencia de electrones desde el dominio reductasa hasta el grupo hemo. La disponibilidad de su sustrato, L-Arginina, y del cofactor BH4 suponen también mecanismos de regulación de la enzima (Govers and Rabelink, 2001).

Se han descrito 5 sitios de **fosforilación** en eNOS que regulan su actividad, dos que inhiben la actividad de eNOS: la **Serina 114**, localizada en el extremo N-terminal, se da en condiciones basales y desaparece tras estimulación con VEGF, y la **Treonina 495**, se localiza

en el dominio de unión a CaM, y se fosforila por las proteína kinasa AMPK y PKC (Chen *et al.*, 1999), (Michell *et al.*, 2001). Las **Serinas 615 y 633**, localizadas en el dominio autoinhibitorio se fosforilan por Akt y PKA, respectivamente, en respuesta a bradikinina, ATP y VEGF y conllevan a la activación de eNOS (Michell *et al.*, 2002). Akt, en respuesta a distintos estímulos, activa eNOS fosforilando la **Serina 1177**, cercana al extremo C-terminal (Fulton *et al.*, 1999), (Dimmeler *et al.*, 1999a). Otras proteínas capaces de fosforilar esta serina son AMPK, PKA, PKG y la kinasa de CaM II (Chen *et al.*, 1999), (Butt *et al.*, 2000), (Fleming *et al.*, 2001). Recientemente se ha descrito que la glicosilación de eNOS cerca del sitio de fosforilación por Akt, inhibe su actividad (Du *et al.*, 2001).

### 3. 1.2 Interacción con otras moléculas

La interacción con múltiples moléculas como **fosfolípidos de membrana** o con su inhibidor endógeno, la **dimetil-L-Arginina** (ADMA) suponen dos de los mecanismos principales de inhibición de eNOS (Venema *et al.*, 1995), (Cooke, 2000).

Otro mecanismo esencial de la regulación de eNOS es su **interacción con caveolina-1**. Las caveolas son microdominios de membrana ricos en colesterol y caveolina-1, implicados en la internalización de proteínas, en el reciclamiento de moléculas al aparato de Golgi, y actúan como centros de compartimentalización de moléculas transductoras de señales, (Parton *et al.*, 1994), (Conrad *et al.*, 1995), (Stahlhut and van Deurs, 2000). La asociación directa de eNOS a caveolina-1 impide la unión de  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM, por lo que mantiene a eNOS inactiva. Se ha descrito que diversos agonistas, como el ionóforo de calcio, A23187, activan eNOS produciendo su disociación de caveolina-1 (Feron *et al.*, 1998). Sin embargo, aunque en condiciones basales la asociación a caveolina-1 disminuye la producción de NO, la caveolina-1 facilita la actividad de eNOS tras estimulación con agonistas (Feron and Balligand, 2006).

Se han descrito además dos proteínas **NOSIP** (eNOS interacting protein) capaz de desacoplar eNOS de la membrana e inhibir su actividad y **NOSTRIN** (eNOS traffick inducer) que regula la translocación de eNOS desde la membrana plasmática hasta vesículas intracelulares (Dedio *et al.*, 2001), (Zimmermann *et al.*, 2002), (Schilling *et al.*, 2006). Por otro lado, eNOS interacciona directamente con el **receptor de bradikinina BK B2**, acoplado a proteínas G, que la mantiene inactiva, al bloquear el transporte de  $\text{e}^-$  de la enzima (Golser *et al.*, 2000). La bradikinina induce una rápida disociación de eNOS, permitiendo así la producción de NO. Otros receptores endoteliales, como el receptor de Angiotensina II (AT-1 Rc) o el de endotelina-1 (ET-1) actúan de forma similar en la regulación de eNOS (Marrero *et al.*, 1999). La bradikinina induce la fosforilación en tirosina de la proteína **Hsp90**, capaz de interaccionar

con eNOS, de forma que permite la interacción de la enzima con la kinasa Akt, permitiendo así la fosforilación de eNOS (Venema, 2002).

### 3.2 FUNCIONES DEL NO ENDOTELIAL

El endotelio es el principal regulador de la homeostasis vascular, manteniendo un equilibrio entre la dilatación y constricción de los vasos, regulando la proliferación y migración de las células del músculo liso (SMCs), la trombogénesis y la fibrinólisis. Se ha propuesto que el defecto en la producción o actividad del NO es una de las principales causas de la disfunción endotelial, que conlleva al daño de la pared vascular y contribuye así al desarrollo de la aterosclerosis (Verbeuren *et al.*, 1986). En este sentido, la producción deficiente de NO implica vasoconstricción, agregación plaquetaria, proliferación y migración de SMCs, adhesión leucocitaria y estrés oxidativo (Endres *et al.*, 1998). Por otro lado, el NO es un factor de supervivencia endotelial, ya que inhibe la apoptosis (Dimmeler *et al.*, 1999b) y aumenta la proliferación celular, probablemente mediante la activación de VEGF y FGF (Dulak *et al.*, 2000), (Ziche *et al.*, 1997). El NO modula también la angiogénesis, proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos pre-existentes; este proceso requiere la degradación de la membrana basal que rodea a las ECs, seguida de la migración y proliferación de estas células (Carmeliet, 2003). En relación con esto, el NO induce la migración endotelial (Ziche *et al.*, 1994), (Murohara *et al.*, 1999), estimulando la podokinesis (Noiri *et al.*, 1998), aumentando la expresión de  $\alpha_v\beta_3$  (Murohara *et al.*, 1999), e induciendo la disolución de la matriz extracelular (ECM) (Ziche *et al.*, 1997).

La generación de ratones deficientes (KO) en eNOS ha supuesto una herramienta importante para determinar muchas de sus funciones en procesos fisiopatológicos. En concreto, estos ratones son incapaces de llevar a cabo el cierre de heridas y presentan una angiogénesis deficiente en respuesta a factores de crecimiento, como se ha demostrado en experimentos *in vitro* e *in vivo* (Lee *et al.*, 1999). El estudio de estos ratones ha mostrado que eNOS presenta un papel importante en la migración, proliferación y diferenciación de las ECs, pasos necesarios para el desarrollo de la angiogénesis.

Estos ratones también presentan una deficiencia cardíaca asociada con la edad y con el sexo, ya que se ha descrito que una mayor proporción de ratones macho mueren a los 21 meses por deficiencia cardíaca, lo que sugiere que eNOS es importante para la homeostasis del corazón. El hecho de no encontrar esta deficiencia en las hembras se debe probablemente a mecanismos de compensación por las otras NOS, ya que a diferencia de los machos, en este

caso se ha encontrado un aumento del mRNA de nNOS e iNOS (Lee *et al.*, 1999), (Li *et al.*, 2004).

## **LAS METALOPROTEINASAS DE MATRIZ**

La primera actividad colagenasa fue aislada de la cola del renacuajo durante la metamorfosis (Gross and Lapiere, 1962). Actualmente, se han identificado 24 metaloproteinasas de matriz (MMPs) diferentes en vertebrados, de las cuales, 23 existen en humanos. También se han identificado MMPs en organismos no vertebrados como la *Drosophila* (Llano *et al.*, 2000), el erizo de mar (Lepage and Gache, 1990) o la hidra (Leontovich *et al.*, 2000); incluso existe una MMP en algas verdes (Kinoshita *et al.*, 1992) y en plantas como la soja (McGeehan *et al.*, 1992).

Las MMPs pertenecen a la superfamilia de las metzincinas, que se caracteriza por tener un motivo altamente conservado con tres histidinas que coordinan un átomo de zinc dentro del dominio catalítico y una metionina conservada cercana al sitio activo del zinc (Stocker and Bode, 1995). Las metzincinas se dividen a su vez en: serralisinas, astacinas, ADAMs/adamalisinas y MMPs. Las MMPs son enzimas capaces de degradar proteínas estructurales de la matriz extracelular cuya actividad catalítica depende del ión zinc y de calcio (McCawley and Matrisian, 2000), (Page-McCaw *et al.*, 2007). Las MMPs presentan especificidades de sustrato diferentes pero a menudo solapantes y en conjunto degradan numerosos sustratos extracelulares, que abarcan prácticamente todas las proteínas de la ECM. Además, estas proteasas son capaces de procesar múltiples moléculas de la superficie celular y otras proteínas pericelulares, regulando así diversos procesos fisiopatológicos, entre los que se incluyen el desarrollo embrionario, la morfogénesis tisular, la reparación de heridas, diversas enfermedades inflamatorias y el cáncer (Sternlicht and Werb, 2001), (Cauwe *et al.*, 2007).

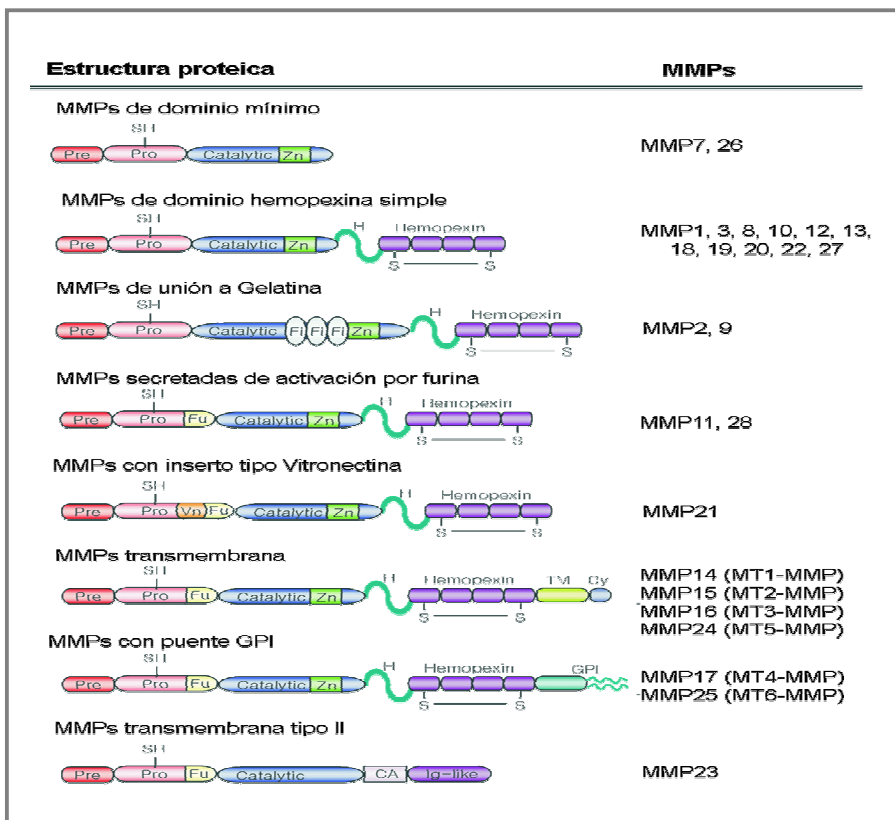
### **1. CLASIFICACIÓN DE LAS MMPs. DOMINIOS Y ESTRUCTURA**

Históricamente, las MMPs se han clasificado en función de su especificidad por los distintos componentes de la matriz extracelular, quedando así agrupadas en colagenasas, gelatinasas, estromilisinias, y matrilisinias. Sin embargo, conforme se han ido identificando nuevos sustratos se ha adoptado una nomenclatura basada en la numeración de las MMPs y una clasificación basada en su estructura (Figura 4). Existen ocho tipos estructurales diferentes de MMPs, de los cuales cinco son MMP solubles y son secretadas al espacio extracelular, de forma que pueden difundir por la ECM y tres están ancladas a la membrana celular (MT-MMPs) por

dominios transmembrana tipo I o tipo II o por anclaje glicofosfatidilinositol (GPI), de forma que desarrollan su actividad desde la membrana celular.

Los genes de las MMPs son estructuralmente semejantes entre ellos, ya que evolucionaron por duplicación de un gen ancestral común.

Las MMPs presentan una estructura mínima común que se compone de un péptido señal o **pre-dominio**, situado el extremo N-terminal, que dirige a la proteína a ser secretada ó anclada a la membrana y es eliminado tras alcanzar el retículo endoplasmático. Seguidamente hay un propéptido o **pro-dominio**, de unos 80 aminoácidos, que contiene una cisteína que mantiene a la enzima en estado latente interaccionando con el zinc del sitio activo, hasta que es procesado, dejando libre el dominio catalítico. Algunas MMPs, justo después del prodominio poseen una secuencia RXKR sensible al corte por furina. El **dominio catalítico**, de aproximadamente unos 160-170 aminoácidos, contiene la región de unión a zinc altamente conservada y determina la especificidad de procesamiento de los diferentes sustratos, mediante bolsillos específicos internos y mediante sitios externos secundarios de unión a sustrato, localizados fuera del sitio activo propiamente dicho (Overall, 2001). MMP-2 y MMP-9, difieren del resto ya que contienen tres tándems de repeticiones de fibronectina (FN) tipo II dentro del extremo N-terminal del dominio catalítico que median la unión a la gelatina (GEL) (Shipley *et al.*, 1996).



**Figura 4.** Dominios de las MMPs.  
Adaptado de Egeblad *et al.* 2002

Todas las MMPs, excepto MMP7, MMP26 y MMP23, presentan un **dominio tipo hemopexina** de aproximadamente 200 residuos que se conecta con el dominio catalítico por una pequeña **región de unión** rica en prolinas (Bode *et al.*, 1996). Este dominio regula la unión de la proteasa a distintos sustratos, a los inhibidores de MMPs, TIMPs, y dirige ciertas actividades proteolíticas (Murphy *et al.*, 1992), (Sanchez-Lopez *et al.*, 1993)

Las MT-MMPs además presentan un **dominio transmembrana** de un sólo paso y una **cola citoplásmica** de 20 aminoácidos en su extremo C-terminal (MMP14, MMP15, MMP16 y MMP24) o una región hidrofóbica C-terminal que actúa como señal de anclaje a membrana de tipo **GPI** (MMP17 y MMP25) (Itoh *et al.*, 1999), (Kojima *et al.*, 2000). Estos dominios juegan un papel esencial en la localización de procesos proteolíticos importantes en sitios específicos de la superficie celular.

## 2. REGULACIÓN DE LAS MMPs

Es imprescindible que exista una regulación fina de la actividad de las MMPs para que sus funciones fisiológicas (o patológicas) se desarrollen de forma correcta, de modo que las MMPs deben expresarse en las cantidades, momentos, localizaciones subcelulares y tipos celulares adecuados.

### 2.1 Regulación transcripcional

La mayoría de las MMPs están reguladas a nivel de la transcripción, exceptuando a MMP2, cuya actividad se ve regulada por activación enzimática (Strongin *et al.*, 1995) y estabilización de mRNA (Overall *et al.*, 1991). La expresión génica de las MMPs está regulada por numerosos factores como los ésteres de forbol, señalización por integrinas, proteínas de la ECM, estrés celular y cambios en la forma celular (Sternlicht *et al.*, 1999), (Werb, 1997). Los factores activadores incluyen citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento (EGF, VEGF, PDGF, KGF, NGF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ), hormonas o el inductor de metaloproteasas de matriz extracelular, EMMPRIN. Muchos de estos estímulos actúan mediante los factores de transcripción AP-1 y Ets (Westermarck and Kahari, 1999). Los glucocorticoides, el ácido retinoico o los esteroides tienen un efecto supresor sobre estos genes (Nagase and Woessner, 1999), (Birkedal-Hansen, 1995).

### 2.2 Regulación post-transcripcional

La estabilización o desestabilización del mRNA también supone un mecanismo de regulación de la expresión de las MMPs. Ciertos factores de crecimiento estabilizan el mRNA

de algunas MMPs, como ocurre con el EGF y PDGF en relación a MMP3 y MMP13, respectivamente, mientras que los el TGF- $\beta$  produce el efecto contrario sobre MMP13 (Delany *et al.*, 1995).

### 2.3 Activación de las MMPs

Las MMPs se sintetizan como proenzimas inactivas o zimógenos, debido a la unión del grupo cisteína-tiol del dominio propeptídico al ión zinc. Su activación implica la ruptura del enlace cisteína-zinc, mediante la proteólisis del dominio propeptídico (por plasmina u otras MMPs). Así, el grupo tiol es reemplazado por una molécula de agua, permitiendo la hidrólisis de diferentes sustratos. Aunque la mayoría de las MMPs no son activadas hasta llegar al exterior celular, las MT-MMPs y algunas MMPs son activadas por convertasas de tipo furina dentro de las rutas de secreción (Pei and Weiss, 1995), (Sato *et al.*, 1996).

### 2.4 Inhibidores endógenos de las MMPs

Los inhibidores tisulares de MMPs (**TIMPs**), TIMP1, TIMP2, TIMP3 y TIMP4, se encuentran en el espacio extracelular e inhiben a las MMPs de forma reversible uniéndose de forma estequiométrica 1:1. Los TIMPs presentan especificidad diferente por las distintas MMPs y difieren entre sí por su regulación génica y expresión tisular específica. La  **$\alpha$ 2-macroglobulina** es el principal inhibidor irreversible endógeno de las MMPs (Baker *et al.*, 2002). Existe otro grupo de inhibidores de gran similitud estructural a los TIMPs que son los **subdominios proteicos** que se producen tras procesamiento proteolítico de determinadas proteínas (Mott *et al.*, 2000). Finalmente, se ha descrito una molécula anclada a la membrana, **RECK** (*reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs*), capaz de inhibir a MMP2, MMP9 y MT1-MMP (Oh *et al.*, 2001), (Miki *et al.*, 2007).

### 2.5 Otros mecanismos de regulación. Asociaciones proteicas

La localización de las MMPs en zonas especializadas de la superficie celular implicadas en la migración e invasión celular es un mecanismo importante de regulación de su actividad que les permite desarrollar su función en momentos y lugares concretos de la célula y del espacio extracelular. Para ello las MMPs se asocian con distintas proteínas que facilitan su movilización a la superficie celular. Por ejemplo, ciertas MT-MMPs se localizan junto con integrinas y otras moléculas en los *invadopodia* (Nakahara *et al.*, 1997), (Hotary *et al.*, 2000). Otras proteínas como CD44,  $\alpha$ v $\beta$ 3 o EMMPRIN se asocian y/o dirigen a MMP solubles como MMP9, MMP2 y MMP1 a la superficie celular (Brooks *et al.*, 1996), (Cauwe *et al.*, 2007).



### 3. ACTIVIDAD DE LAS MMPs

La **ECM** actúa como andamiaje celular pero además influye en el comportamiento celular ya que secuestra numerosas moléculas de señalización y a la vez es un ligando de los receptores de adhesión celular, las integrinas, que transducen señales al interior celular. Las MMPs regulan diferentes procesos como la forma, el movimiento, el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celular mediante el **procesamiento de la ECM** (Lukashev and Werb, 1998).

Las MMPs también influyen en el comportamiento celular al **liberar numerosas moléculas bioactivas**, como TGF- $\beta$ , FGF-1, o el IGF-1, que al unirse a sus receptores celulares desencadenan múltiples cascadas de señalización (Imai *et al.*, 1997), (Whitelock *et al.*, 1996) (Manes *et al.*, 1997), (Fowlkes *et al.*, 1994), (Fowlkes *et al.*, 1995). Por otro lado, las MMPs **procesan moléculas de la superficie celular**, lo que conlleva a su activación o inactivación, desencadenando o bloqueando así distintas vías de señalización celular. De esta manera, las MMPs controlan distintos procesos como la invasión, la adhesión a determinadas ECMs o la migración celular (Cauwe *et al.*, 2007).

### 4. FUNCIONES DE LAS MMPs

Debido a la variedad de sustratos y funciones regulados por las MMPs, éstas presentan un papel esencial en numerosos procesos fisiológicos, como la morfogénesis tisular, invasión y migración celular, reparación de heridas, vasculogénesis o desarrollo del hueso, a la vez que en múltiples procesos patológicos como el cáncer, enfermedades inflamatorias y autoinmunes como la artritis, enfermedades cardiovasculares, fibróticas y cerebrovasculares.

La angiogénesis requiere la degradación de la membrana basal, la migración y la proliferación de las ECs (Carmeliet, 2003). En este sentido, las MMPs desempeñan un papel esencial en la degradación de la ECM previa a la migración, activan o inactivan determinados factores pro o antiangiogénicos y favorecen la migración celular y la formación de tubos.

La actividad de las MMPs en patología se ha asociado principalmente con la invasión tumoral y la metástasis, pero estas proteasas también presentan un papel esencial en procesos tempranos del desarrollo tumoral al regular el crecimiento y supervivencia celular liberando factores de crecimiento, activando receptores, citoquinas y quimioquinas, o moléculas de adhesión, o bien inactivando proteínas de unión a dichos factores y modificando la estructura de los componentes de la ECM, (Oh *et al.*, 2001), (McCawley and Matrisian, 2001).

La creación de ratones deficientes para genes específicos está ayudando a atribuir nuevas funciones a las MMPs. La mayoría de los ratones deficientes para MMPs son viables y no presentan grandes diferencias fenotípicas con los ratones de genotipo silvestre. Esto podría deberse a una falta de función en los procesos vitales del desarrollo embrionario o bien a una redundancia en la actividad de las distintas MMPs. Algunos de los defectos más significativos de estos ratones incluyen alteraciones en el remodelamiento vascular y la angiogénesis (MMP2, MMP9, MMP12, MMP14), defectos en el desarrollo o remodelamiento del hueso (MMP9, MMP13, MMP14) o alteraciones en el sistema inmune y la respuesta inflamatoria (MMP7, MMP8, MMP10, MMP28,) (Page-McCaw *et al.*, 2007) .

### MT1-MMP

MT1-MMP (MMP14) desempeña un papel esencial en multitud de procesos celulares y en desarrollo así como en distintas situaciones fisiopatológicas (Holmbeck *et al.*, 1999), (Zhou *et al.*, 2000), (Sounni *et al.*, 2003). Los ratones deficientes para MT1-MMP son los únicos mutantes de MMPs letales ya que mueren entre las 3 y 12 semanas de edad. Aunque son normales en su nacimiento, desarrollan muchas anomalías como retardo en el crecimiento, defectos importantes en el desarrollo esquelético y del tejido conectivo (probablemente debido a un defecto en el remodelamiento del COL I), defectos en la vascularización y angiogénesis, alteraciones en el desarrollo pulmonar, en la maduración de adipocitos y en la invasión de la pared arterial y la formación de la neoíntima por VSMCs (Zhou *et al.*, 2000), (Holmbeck *et al.*, 1999), (Oblander *et al.*, 2005), (Chun *et al.*, 2006), (Filippov *et al.*, 2005), (Lehti *et al.*, 2005) (Figura 5). Esto refleja la importancia fisiológica de esta MMP como regulador de múltiples cascadas de señalización y procesos celulares.

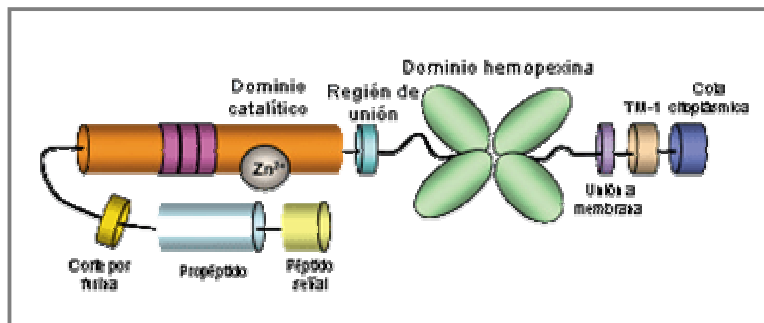


**Figura 5.** Diferencias entre ratones de genotipo silvestre y ratones deficientes en MT1-MMP. Adaptado de Somerville *et al.* 2003.

### 1. DOMINIOS DE MT1-MMP

MT1-MMP es una proteasa de 582 aminoácidos que se traducen en un peso molecular de 63 kDa. Su estructura proteica puede observarse en la Figura 6. MT1-MMP se produce como zimógeno y requiere de la eliminación proteolítica del propéptido para su activación. La

resolución de la estructura tridimensional de su dominio catalítico, demostró la existencia de dos bucles expuestos que podrían ser importantes para la interacción con distintos sustratos (Fernandez-Catalan *et al.*, 1998).



**Figura 6.** Dominios de MT1-MMP. Adaptado de Folgueras *et al.* 2004.

## 2. REGULACIÓN DE MT1-MMP

### 2.1 Transcripción

Existen regiones consenso de unión a factores de transcripción como Sp1, Egr-1, AP-4, NF-κB, Cbfa1 y c-ETS1 en el promotor del gen de MT1-MMP humano (Lohi *et al.*, 2000), (Jimenez *et al.*, 2001). El aumento de unión del factor de transcripción Egr-1 al promotor de MT1-MMP desplaza a Sp1 de su sitio, responsable de su expresión constitutiva resultando en una inducción de MT1-MMP en respuesta a la ECM en ECs de rata (Haas *et al.*, 1999). Otros factores de transcripción como NF-κB y NFAT están implicados en la inducción de la expresión de MT1-MMP en respuesta a TNF-α (Han *et al.*, 2001). Estos factores también regulan la expresión de MT1-MMP en células mesangiales (Alfonso-Jaume *et al.*, 2004).

### 2.2 Maduración y mecanismos proteolíticos

MT1-MMP contiene el motivo básico RXKR insertado entre el prodominio y el dominio catalítico, reconocido por convertasas tipo furina, PACE-4, PC6 ó PC7. La ruptura del propéptido de MT1-MMP tiene lugar en el trans Golgi y genera una enzima madura (Yana and Seiki, 2002), (Rozanov *et al.*, 2001). MT1-MMP sufre también procesos autocatalíticos, liberando así distintas formas solubles (Toth *et al.*, 2002), (Osenkowski *et al.*, 2004). Otros mecanismos proteolíticos, mediados por plasmina (Okumura *et al.*, 1997), MT3-MMP (Shofuda *et al.*, 2001) o ADAMs (Toth *et al.*, 2006) liberan a su vez fragmentos solubles de MT1-MMP activos o inactivos.

### 2.3 Inhibición

MT1-MMP se encuentra activa en la superficie celular y este hecho hace que su inhibición sea uno de los pasos críticos para la regulación de su actividad. Como todas las MT-MMPs, MT1-MMP es inhibida por TIMP2, 3 y 4, pero no por TIMP-1 (Garcia-Cardena *et al.*, 1996), (Bigg *et al.*, 2001). Otro de los inhibidores de MT1-MMP, comentado anteriormente, es RECK, una glicoproteína con puente GPI, descrita inicialmente como supresor de la invasión tumoral (Miki *et al.*, 2007). También se han descrito otras moléculas capaces de inhibir a MT1-MMP como los proteoglicanos condroitin/heparan sulfato y testican 1 y 3, aunque sus mecanismos de acción aún se desconocen (Nakada *et al.*, 2001).

### 2.4 Localización en la superficie celular. Interacciones proteicas

La degradación focal de la ECM es esencial para que se desarrolle la migración direccional, ya que la ECM supone una barrera en la dirección de la migración. Para ello, las ECs localizan a MT1-MMP en los *lamellipodia* del frente de avance de las células (Itoh *et al.*, 2001), (Galvez *et al.*, 2001). Esta localización se consigue mediante la interacción de MT1-MMP con otras proteínas como el CD44 a través del dominio hemopexina (Mori *et al.*, 2002). CD44 se une a su vez con la F-actina a través de la interacción con proteínas Ezrina/Radixina/Moesina (Naor *et al.*, 1997). MT1-MMP se encuentra también activa en los *invadopodia*, estructuras especializadas formadas por la polimerización de actina mediada por el complejo Cdc42-N-WASP-Arp2/3 (Nakahara *et al.*, 1997), (Artym *et al.*, 2006). También se ha descrito interacción entre MT1-MMP y la integrina  $\alpha v \beta 3$ , lo que favorece la activación de proMMP-2, así como colocalización de MT1-MMP con integrinas tipo  $\beta 1$ , aunque se desconoce si existe una interacción directa o indirecta entre ambas proteínas (Galvez *et al.*, 2002), (Suenaga *et al.*, 2005). MTCBP-1, *MT1-MMP cytoplasmic binding protein-1*, es otra proteína que interacciona con la cola citoplásmica de MT1-MMP suprimiendo así la migración celular mediada por MT1-MMP (Uekita *et al.*, 2004).

### 2.5 Tráfico y compartimentalización

MT1-MMP es internalizada por mecanismos dependientes de clatrina y de caveolina (Jiang *et al.*, 2001), (Uekita *et al.*, 2001), (Remacle *et al.*, 2003), (Galvez *et al.*, 2004). Esta internalización, en la que es importante la cola citoplásmica, a pesar de que disminuye la cantidad de MT1-MMP en la superficie celular, es un proceso esencial para promover la migración celular (Uekita *et al.*, 2001), (Galvez *et al.*, 2004).

Una parte de la MT1-MMP es conducida a lisosomas para su posterior degradación, de hecho, recientemente se ha descrito la interacción directa de MT1-MMP con una tetraspanina, CD63, componente de membranas de endosomas tardíos y de lisosomas (Takino *et al.*, 2003). Sin embargo, tras la internalización, MT1-MMP también es reciclada de nuevo a la superficie celular. En este proceso juega un papel esencial una secuencia DKV en el extremo C-terminal de la cola citoplásmica de MT1-MMP (Wang *et al.*, 2004). Finalmente, existe otro mecanismo de regulación del tráfico de MT1-MMP, descrito recientemente: la GTPasa Rab8, implicada en el transporte polarizado y la exocitosis de proteínas a las protrusiones de membrana dirige el reclutamiento de MT1-MMP a estructuras de membrana implicadas en la invasión de matrices de COL tridimensional (Bravo-Cordero *et al.*, 2007).

## 2.6 Dimerización

La formación de homo-oligómeros a través de los dominios hemopexina, transmembrana y/o citoplásmico de MT1-MMP también supone un mecanismo de regulación de su actividad en la superficie celular (Osenkowski *et al.*, 2004). Se ha descrito que la presencia de Rac-1 constitutivamente activa induce la oligomerización y promueve la localización de la proteasa a *lamellipodia* (Lehti *et al.*, 2002), (Itoh *et al.*, 2001). Por otro lado, quimioquinas implicadas en la angiogénesis como CCL2 y CXCL8 modulan la formación de dímeros de MT1-MMP a través de la activación PI3K y Rac, y de la polimerización de actina cortical en ECs (Galvez *et al.*, 2005).

## 2.7 Otros mecanismos

La activación de diversas **cascadas de señalización** como ERK, MAPK, PKC, o GTPasas RhoA y Rac1, aumentan la expresión de MT1-MMP (Esparza *et al.*, 1999), (Park *et al.*, 2000; Gingras *et al.*, 2001), (Takino *et al.*, 2004), (Bartolome *et al.*, 2004), (Zhuge and Xu, 2001), o bien favorecen la actividad de MT1-MMP como PI3K y Src (Hess *et al.*, 2003), (Sounni *et al.*, 2004). Recientemente se ha descrito que la **fosforilación** mediada por Src **en la tirosina** localizada en la cola citoplásmica de MT1-MMP supone un mecanismo importante en la regulación de la migración celular (Nyalendo *et al.*, 2007). Finalmente, se ha descrito que la **palmitoilación** de MT1-MMP es también importante para su internalización y la inducción de la migración celular (Anilkumar *et al.*, 2005). Por otra parte, la **O-glicosilación** favorece la autoinhibición de la proteasa (Remacle *et al.*, 2006) y altera la formación del complejo MT1-MMP/TIMP2/pro-MMP2 (Wu *et al.*, 2004).

### 3. ACTIVIDAD DE MT1-MMP

MT1-MMP presenta una gran variedad de sustratos de la ECM como son los colágenos tipo I, II y III, fibrina, fibronectina, vitronectina, laminina, fibrinógeno y proteoglicano (Hiraoka *et al.*, 1998), (Koshikawa *et al.*, 2000), (Somerville *et al.*, 2003), (Itoh, 2006) y a su vez es capaz de procesar muchas otras moléculas como proteínas de la membrana celular y de activar a otras MMPs.

#### 3.1. Degradación de proteínas de la ECM

El colágeno es uno de los principales componentes de la ECM y uno de los sustratos degradados más importantes durante la migración. MT1-MMP es la principal collagenasa anclada a membrana. Las collagenasas degradan la triple hélice de colágeno, generando así gelatina, susceptible de degradación por otras MMPs. Además, esta proteasa es la principal collagenasa capaz de promover invasión celular en matrices de colágeno tipo I y colágeno tridimensional (Hotary *et al.*, 2003), (Sabeh *et al.*, 2004). Otro sustrato importante que ha de ser degradado durante la migración e invasión celular es la fibrina y en relación con esto, MT1-MMP es también la principal fibrinolisisina en endotelio (Hiraoka *et al.*, 1998).

#### 3.2 Procesamiento de otras moléculas

La actividad de MT1-MMP es importante para procesar muchas proteínas de la membrana celular. En este sentido es capaz de **madurar y/o activar** moléculas de adhesión (integrinas  $\text{pro}\alpha_v$ ,  $\alpha_3$  y  $\alpha_5$ ), citoquinas ( $\text{proTGF-}\beta$ ) y proteínas estructurales (sindecán o betaglicano), **inactivar o degradar** moléculas de adhesión (integrinas  $\beta_4$ , tTG y CD44), receptores (EMMPRIN, LPR) y proteínas de uniones intercelulares (E-cadherina y N-cadherina) y **procesar** citoquinas (RANKL,  $\text{proTNF-}\alpha$ ) y receptores (semaforina 4D, EMMPRIN) (Cauwe *et al.*, 2007). MT1-MMP también es capaz de activar otras MMPs como MMP-13 (Knauper *et al.*, 2002) o MMP2. En este caso, mediante el mecanismo clásico de dimerización de MT1-MMP: MT1-MMP forma un complejo con TIMP2 en la membrana a través del dominio catalítico de la enzima y el dominio inhibidor de TIMP2. El dominio C-terminal de TIMP2 se une al dominio hemopexina de pro-MMP2, formándose así un complejo ternario (Strongin *et al.*, 1995). Otras MT1-MMPs de la membrana forman homo-oligómeros y pueden así activar a pro-MMP2 (Itoh *et al.*, 2001), (Lehti *et al.*, 2002).

## 4. FUNCIONES DE MT1-MMP

### 4.1 Migración e invasión celular

MT1-MMP estimula la motilidad celular al aumentar la degradación de la ECM, pero cada vez se hace más evidente que esta proteasa presenta otras funciones más allá de “abrir paso” para la migración. MT1-MMP degrada una gran variedad de componentes de la ECM como colágenos tipo I, II y III, lamininas 1 y 5, fibronectina, vitronectina, fibrina y agrecán. De estos, el colágeno es uno de los principales componentes de la estructura tisular, por lo que supone uno de los sustratos degradados más importantes durante la migración y MT1-MMP es la principal collagenasa en ECs. La exposición de sitios críticos de adhesión o la liberación de fragmentos de la ECM también promueven la migración. Así la degradación de la laminina 5, componente glicoproteico de la membrana basal epitelial, expone sitios críticos en la cadena  $\gamma 2$  y libera dominios tipo EGF (Koshikawa *et al.*, 2000), (Itoh, 2006). MT1-MMP también amplifica la proteólisis de la ECM al activar distintas MMPs, como MMP2 o MMP13, de forma que estas MMPs degradan distintos sustratos de la ECM (Itoh, 2006).

Por otro lado, se ha descrito que MT1-MMP estimula la migración mediante el procesamiento de distintas moléculas como proteínas de adhesión celular u otras MMPs. En este sentido, el procesamiento de CD44 (Kajita *et al.*, 2001), integrinas (Deryugina *et al.*, 2002; Ratnikov *et al.*, 2002) o sindecán-1 (Endo *et al.*, 2003) promueve la migración; esto podría deberse a cambios en la maquinaria de adhesión a la ECM o a la activación de rutas de señalización mediadas por estas proteínas.

Finalmente, MT1-MMP activa proteínas de señalización extracelular como ERK, proceso esencial para la migración inducida por MT1-MMP (Gingras *et al.*, 2001).

### 4.2 Angiogénesis

La angiogénesis es esencial en múltiples procesos fisiopatológicos como la cicatrización de heridas, el crecimiento y progresión tumoral o la artritis reumatoide. Estudios recientes con tejidos de ratones deficientes en MT1-MMP han demostrado que aunque proteasas como MMP2 o MMP9 y receptores como CD44 o  $\alpha_v\beta 3$  integrinas son importantes para la angiogénesis, sólo MT1-MMP es esencial para la formación de vasos sobre matrices de colágeno (Chun *et al.*, 2004). Así, ratones deficientes para MT1-MMP presentan una formación deficiente de nuevos vasos en ensayos de angiogénesis en cornea de ratón (Zhou *et al.*, 2000). Por otro lado, el bloqueo de la actividad de MT1-MMP con anticuerpos frente a su dominio catalítico impide la migración endotelial (Galvez *et al.*, 2001). Además, se ha descrito que las

ECs deficientes en MT1-MMP presentan una migración y formación de angiotubos alteradas (Galvez *et al.*, 2005).

MT1-MMP es a su vez capaz de inducir factores de crecimiento, como VEGF-A, que contribuyen al desarrollo de la angiogénesis (Sounni *et al.*, 2004). También se ha descrito que MT1-MMP está implicada en el reclutamiento y proliferación de VSMCs inducidos por PDGF, contribuyendo así al desarrollo, función y estabilización de nuevos vasos (Lehti *et al.*, 2005). Por otro lado, como ya hemos comentado, la modulación que ejerce MT1-MMP sobre numerosas moléculas, como la degradación o inactivación de proteínas estructurales (sindecán-1) o de uniones intercelulares (E-cadherina), o la modulación de ciertas integrinas ( $\alpha_v\beta_3$ ) alteran la adhesión entre las células y a la ECM, favoreciendo la migración e invasión. De la misma manera, la modulación de receptores (semaforina 4D, EMMPRIN), y citoquinas (proTGF- $\beta$ ) favorecen el desarrollo de la angiogénesis (Cauwe *et al.*, 2007).

### 4.3 Tumorigénesis

La expresión de MT1-MMP está asociada con la invasividad y malignidad de muchos tumores como carcinomas de pulmón, gástricos, de colon, y mamarios, así como con gliomas y melanomas (Sounni *et al.*, 2003), (Sato *et al.*, 2005). Además de degradar múltiples componentes de la ECM, MT1-MMP contribuye a la invasión tumoral mediante la proteólisis de distintas moléculas como MUC-1, tTG, integrinas, sindecán-1, CD44 y LRP. Por otro lado, activa a MMP2 y concentra su actividad proteolítica en la superficie celular, paso fundamental para la degradación de la membrana basal necesaria para la invasión y posterior metástasis de células cancerígenas (Itoh and Seiki, 2006), (Sato *et al.*, 2005). La sobreexpresión de MT1-MMP aumenta la invasividad celular tanto *in vitro* como *in vivo* (Sato *et al.*, 1994), (Tsunezuka *et al.*, 1996), mientras que el silenciamiento de la proteína por RNA de interferencia disminuye la invasión de células cancerígenas (Ueda *et al.*, 2003). Por último, MT1-MMP coopera con otras MMPs en el crecimiento e invasión tumoral; en relación con esto, recientemente se ha descrito que el crecimiento tumoral dependiente de MT1-MMP requiere la presencia de MMP2 derivada del estroma (Taniwaki *et al.*, 2007).

### 4.4 Otras funciones

Como ya hemos comentado, MT1-MMP desempeña un papel importante en muchas otras funciones fisiológicas. Es importante mencionar que su actividad colagenolítica está implicada en el desarrollo óseo (Zhou *et al.*, 2000), en la maduración de los adipocitos en matrices tridimensionales (Chun *et al.*, 2006) y en la invasión de la pared arterial por VSMCs y



posterior formación de la neoíntima (Filippov *et al.*, 2005). Además, MT1-MMP es capaz de inducir la activación de citoquinas y otras proteínas.

## OBJETIVOS

La metaloproteinasa de matriz MT1-MMP desempeña un papel fundamental en la angiogénesis. Por ello, nos propusimos estudiar distintos aspectos de la implicación y regulación de MT1-MMP durante dicho proceso. En concreto, analizamos la posible relación entre MT1-MMP y el NO, ya que éste es un importante modulador de distintos pasos que ocurren durante la angiogénesis. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Análisis de la implicación de MT1-MMP en la formación de angiotubos por células endoteliales (ECs) inducida por distintos factores angiogénicos *in vitro*.
2. Caracterización de la regulación de MT1-MMP por el óxido nítrico (NO) en ECs humanas y murinas.
3. Estudio de la relación funcional entre MT1-MMP y el NO durante la angiogénesis en ECs humanas y murinas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ANTICUERPOS Y REACTIVOS

Los anticuerpos (Ab) anti-MT1-MMP se generaron en el laboratorio como se ha descrito previamente (Galvez *et al.*, 2001). Estos anticuerpos anti-MT1-MMP, LEM-2/15, LEM-2/63 son anticuerpos de tipo IgG1,k, e IgG2a, k, respectivamente. Los anticuerpos anti-VE-cadherina (TEA1/31) y anti-CD31 (TP1/15) han sido descritos previamente (Yanez-Mo *et al.*, 1998). Los anticuerpos monoclonales (mAbs), anti-caveolina-1 (clon 2234) y anti-eNOS (clon 3) se compraron a BD Transduction Laboratories (Lexington, KY). Los anticuerpos anti-ICAM-2 (CD102) (clon 3C4 mIC2/4), el anti-CD16/CD32 (Fcγ III/II Rc) eran de BD Biosciences PharMingen (San Jose, CA). El anticuerpo policlonal (pAb) anti-fosfo-eNOS (Ser 1177) es de Cell Signalling Technology (Danvers, MA). El anti-CD31 de ratón (clon MEC13.3) fue amablemente decido por E. Dejana. Los mAbs anti-tubulina (clon B512), anti-COL I, la gelatina tipo IV y la bradikina eran de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El COL I era de ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA) y de Roche Farma (Basel, Switzerland). Las bolas magnéticas recubiertas de anticuerpos de cabra anti-ratón eran de Dynal Biotech (Oslo, Noruega). Las quimioquinas CCL2 (MCP-1: *monocyte chemotactic protein-1*) y CXCL12 (SDF-1: *stromal-derived factor-1*) eran de R&D Systems (Minneapolis, MN). Los donadores de NO DETA-NONOato y DEA-NONOato eran de Alexis Biochemicals (Carlsbad, CA) y el SNAP, L-NAME, DAF-FM y DQ<sup>TM</sup>-Collagen tipo I (DQ-COL I) eran de Molecular Probes (Invitrogen, Carlsbad, CA). Todos los agentes químicos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich excepto que se indique lo contrario.

### CULTIVOS CELULARES

#### ECs humanas de cordón umbilical (HUVEC)

Las HUVEC se purificaron como se ha descrito previamente (Arroyo *et al.*, 1992): la vena de los cordones umbilicales se canuló y lavó con NaCl 0.9N. Posteriormente se incubó durante 20 minutos con colagenasa a 1mg/ml a 37°C y las ECs se obtuvieron al lavar de nuevo la vena con HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (Biowhittaker, Cambrex). La suspensión celular obtenida se centrifugó y se incubó 24 horas en flasks de 25cm<sup>2</sup>. Tras lavar las células, se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia en medio 199 de Bio Whittaker (Walkersville, MD) suplementado con 20% suero bovino, 50 IU/ml de penicilina, 50μg/ml de estreptomycin, y 2.5

µg/ml de fungizona. Tras el primer pase, las células se crecieron en placas recubiertas de GEL al 0.5% suplementadas con 50 µg /ml de extracto de crecimiento de cerebro bovino y con 100 µg/ml de heparina. Para los ensayos funcionales ó de actividad, las células se plaquearon en GEL 1% y se privaron de suero 16 horas antes de los experimentos. Estas células se usaron entre los pases 3 y 5. La migración de estas células se indujo por disrupción de la monocapa celular con heridas hechas con un rascador (*wound-healing*) o bien plaqueando las células en subconfluencia (SC).

### **ECs de pulmón de ratón (MLEC)**

Para el aislamiento de MLEC se usaron ratones de cepa C57BL6/J deficientes en MT1-MMP (*Mmp14*) ó eNOS (NOS3) que han sido caracterizados previamente (Zhou *et al.*, 2000), (Lee *et al.*, 1999). Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron sus pulmones. Tras lavar los pulmones en etanol al 70% y en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) F-12 (Biowhittaker, Cambrex) se obtuvo un homogeinizado tisular que se digirió durante 1 hora en 1mg/ml de colagenasa a 37°C. Posteriormente se disgregaron y filtraron hasta producir una suspensión celular, que tras centrifugar se plaqueó durante 24 horas sobre una matriz compuesta de GEL 0.1%, COL 30µg/ml, FN 10µg/ml. La población celular obtenida se sometió en primer lugar a una selección negativa con anticuerpos anti-CD16 de ratón para eliminar los macrófagos y después a una selección positiva con anticuerpos anti-ICAM-2 de ratón acoplados a bolas magnéticas. La pureza de la población endotelial obtenida se comprobó mediante tinciones de inmunofluorescencia y por citometría de flujo con anticuerpos anti-CD31, obteniéndose al menos un 90% de pureza. Estas células se usaron hasta pase 4.

### **MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA**

Las ECs, se plaquearon sobre cubreobjetos de 22mm de diámetro recubiertos con 1% de GEL, y se fijaron con 4% paraformaldehído 2% sacarosa en HNSS durante 5-10 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron dos veces durante 15 minutos con TBS. Después de bloquear los cristales con TNB (Blocking Reagent Boehringer) o BSA 2% durante 30 min a 37°C, se incubaron durante 30 minutos a 37°C con el anticuerpo primario correspondiente: anti-MT1-MMP, LEM-2/15 ó LEM-2/63, anti-eNOS o anti-COL I y tras 3 lavados con TBS (3x5 minutos) se incubaron durante 20 minutos con el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo Alexa 488 (fluorescencia en verde) o Alexa Cy3 (fluorescencia en rojo).

Tras lavar de nuevo 3 veces, los cristales se montaron con Mowiol (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) o ProLong Gold (Invitrogen) y se dejaron secar. Para las tinciones de eNOS, tras fijar las células, éstas se permeabilizaron durante 2 minutos con Tritón X-100 0.1% en PBS a 4°C. Las muestras se examinaron en un microscopio de fluorescencia Axioscop-40 (Zeiss) con objetivos de 63x y 40x o en un microscopio confocal (Biorad Radiance 2100 o Leica TCS SP2-AOBS). Para cuantificar la acumulación (*clustering*) de MT1-MMP en ECs en migración, las HUVEC se trataron con donadores de NO a distintos tiempos y se analizó la distribución de MT1-MMP por inmunofluorescencia. Se examinaron al menos 15 células por cada tratamiento y tiempo en seis experimentos independientes. Para realizar una comparación cuantitativa de la distribución de MT1-MMP entre MLEC de genotipo silvestre y deficientes en eNOS se contaron al menos 80 células en tres experimentos independientes. De esta manera se distinguieron dos patrones de tinción: MT1-MMP concentrada en *lamellipodia/filopodia* o un patrón más difuso y punteado. De forma paralela estos patrones de tinción se analizaron visualizando los perfiles de intensidad de fluorescencia con el *software* Laserpix. Todos los contajes se realizaron a doble o triple ciego.

## **FRACCIONAMIENTO CELULAR EN GRADIENTE DE FLOTACIÓN**

Aproximadamente  $15 \times 10^3$  ECs confluentes crecidas sobre GEL 1% ó COL I 10µg/ml se lavaron 2 veces con PBS y se lisaron en tampón 25 mM MES pH6.5, 0.15 mM NaCl, 0.5% Triton X-100; los lisados se pasaron 6 veces por una aguja de 21G y se centrifugaron 10 minutos a 6000 rpm para eliminar los restos celulares. Se recogió el sobrenadante y se mezcló con sacarosa 80% en relación 1:1. Seguidamente se pasó la mezcla a los tubos de la centrífuga y se añadió sacarosa al 40% y 5%. Tras 16 horas de ultracentrifugación a 35.000rpm en el gradiente discontinuo de sacarosa (40-30-5%) se recogieron las distintas fracciones. Las proteínas se precipitaron con acetona durante 2 horas a -20°C y se centrifugaron a 13.000rpm durante 10 minutos. Se recogieron los precipitados y se resuspendieron en tampón RIPA. Las muestras se resolvieron en geles SDS-PAGE 10% y se analizaron por *western blot* como se describe posteriormente.

## **MEDIDA Y DETECCIÓN *IN SITU* DE LA PRODUCCIÓN DE NO**

Las HUVEC se crecieron hasta alcanzar la confluencia y se pretrataron o no con el inhibidor de las sintasas de NO L-NAME (500 µM). La migración se indujo por disrupción de la monocapa celular. La producción de NO se determinó por la acumulación de nitritos (NO<sub>2</sub>)

en el medio celular tras 15 o 30 minutos: los nitritos se redujeron con NaI acidificado y el producto de NO resultante se detectó en un analizador de NO, NOA 280 (Sievers Instruments, Boulder, CO). Los picos detectados se integraron con el *software* Origin. Para la visualización in situ de la producción de NO, usamos una sonda específica de NO permeable a la membrana celular, DAF-FM-diacetato. Las MLEC o HUVEC se incubaron con 5 $\mu$ M de DAF-FM en HBSS suplementado con 1% suero bovino fetal (FBS) durante 30 minutos y tras ser lavadas 4 veces con PBS, se observaron en un microscopio confocal (Biorad Radiance 2100 o Leica TCS SP2-AOBS). Para los ensayos en tiempo real en HUVEC se realizó un seguimiento por microscopía confocal en distintos periodos de tiempo. Se grabaron las imágenes de fluorescencia y de contraste de fase a intervalos de 20 segundos durante 6 minutos.

### **ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO**

Las ECs confluentes o en migración (SC ó *wound-healing*) se trataron con una concentración 100 $\mu$ M de distintos donadores de NO: DEA-NONOato o DETA-NONOato, o con 500  $\mu$ M de L-NAME durante 16 horas. Tras lavar las ECs 2 veces con PBS, se despegaron con un tampón de disociación celular libre de enzima, Cell Dissociation Buffer (Beckton-Dickinson) y se resuspendieron en PBS. Aproximadamente unas 3 x 10<sup>5</sup> células se incubaron con sobrenadantes anti-MT1-MMP, LEM-2/15 para HUVEC y LEM-2/63 para MLEC o anti-CD31 (TP1/15 para HUVEC o MEC 13.3 para MLEC) durante 30 minutos a 4°C. Tras lavar las ECs con PBS se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón fluoresceinado. Finalmente, las muestras se analizaron en un citómetro FACSCanto® (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) o Cytomics-FC500 (Beckman-Coulter, Fullerton, CA).

### **ENSAYOS DE WESTERN BLOT**

Las ECs estimuladas o no según se especifica en cada pie de figura, se lavaron con HBSS y se lisaron directamente en tampón Laemmli. Los lisados celulares se resolvieron junto con patrones de peso molecular (See Blue Plus, Invitrogen) en geles de poliacrilamida-SDS al 10% en condiciones reductoras y las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Pierce, Rockford, IL) mediante tranferencia húmeda en tampón Tris-glicina con 20% Metanol. Tras teñir con rojo Ponceau, las membranas se bloquearon durante 30 minutos con 5% de leche desnatada en tampón TBS con 0.05% de Tween-20; posteriormente se incubaron durante 1 hora con los anticuerpos primarios correspondientes: anti-MT1-MMP, LEM-2/15 (ó LEM-2/63 para

las muestras de ratón), anti-VE-cadherina (TEA1/31), anti-eNOS, anti-ERK, anti-tubulina, anti-caveolina-1, anti-fosfo-eNOS o anti-fosfo-ERK (las incubaciones para proteínas fosforiladas se realizaron durante toda la noche a 4°C). Tras lavar las membranas 3 veces (3x15 minutos) con el mismo tampón, se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (conejo anti-ratón ó cabra anti-conejo) conjugados con peroxidasa. Las bandas proteicas se visualizaron por quimioluminiscencia (ECL; Amersham Pharmacia Biotech). La densitometría se realizó mediante escáner (HP scanjet 5530) de las películas autoradiografiadas y análisis con el software Image J. VE-cadherina ó tubulina se utilizaron como control de carga.

### **DETECCIÓN *IN SITU* DE ACTIVIDAD COLAGENOLÍTICA**

Teniendo en cuenta que MT1-MMP es la principal collagenasa en ECs (Chun *et al.*, 2004) se usó la degradación de COL I para analizar la actividad de MT1-MMP en estas células. En primer lugar, para las ECs humanas se utilizó un sustrato conjugado a fluoresceína, DQ-COL I, que emite fluorescencia cuando es procesado. De esta forma, cuando el DQ-COL I es degradado se pueden visualizar áreas fluorescentes en la membrana celular. Las HUVEC se plaquearon sobre 10µg/ml de COL I o DQ-COL I y se trataron con 1µM de bradikinina o 100 µM de DETA-NONOato de 1 a 6 horas. Tras fijar las células con PFA 4%, sacarosa 2% durante 5 minutos, las muestras se analizaron en un microscopio de fluorescencia Axioscop-40 (Zeiss). Se contaron al menos 40 células por condición. También se utilizó otra aproximación para visualizar la degradación de COL I: MLEC procedentes de ratones deficientes o no en MT1-MMP ó en eNOS se plaquearon sobre 1mg/ml de COL I de cola de rata (Roche Farma) y se estimularon con 1µM de bradikinina o con 10nM de CXCL12 durante 24 horas. Tras fijar las células con PFA 4%, sacarosa 2% durante 5 minutos, se tiñó el COL I siguiendo el protocolo de inmunofluorescencia descrito anteriormente y las muestras se analizaron en el microscopio de fluorescencia. Las áreas oscuras alrededor de las ECs corresponden a la degradación del COL I. Estas áreas se cuantificaron con el software Laserpix. Se contaron al menos 10 células por experimento en 4 experimentos independientes.

### **ENSAYOS DE ZIMOGRAFÍA**

Las ECs plaqueadas sobre GEL 1% se privaron de suero 16 horas antes del experimento. Se estimularon con bradikinina o donadores de NO a distintos tiempos y se lisaron como se describe en el apartado de *western blot*. A continuación, se resolvieron en geles SDS-PAGE 10% a los que se había añadido 1mg/ml de fibrinógeno o GEL en condiciones no

reductoras. A continuación los geles se lavaron 3 veces en 2.5% Tritón X-100 durante 1 hora, se aclararon con agua destilada y se incubaron durante 12 h a 37°C con un tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, y 200 mM NaCl. Finalmente los geles se tiñeron con azul Coomassie y las áreas de actividad fibrinolítica o gelatinolítica se visualizaron como bandas transparentes.

### **EXTRACCIÓN DE FRACCIONES DE MEMBRANA CELULAR CON TRITÓN X-114**

Se trataron HUVEC en subconfluencia con DEA-NONOato o DETA-NONOato durante distintos tiempos y se aisló la membrana celular por fraccionamiento con Tritón X-114: se obtuvieron lisados celulares con 1.5% de Tritón X-114, y tras centrifugar a 4°C a 10000 rpm durante 5 minutos, se incubaron a 37°C durante 2 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 10000rpm durante 5 minutos y se extrajeron las fracciones hidrofílica (correspondiente a la fracción citosólica o positiva para tubulina) e hidrofóbica (fracción de membrana, positiva para caveolina-1). Las muestras se procesaron entonces como se describe en el apartado de *western blot*.

### **ENSAYOS DE MIGRACIÓN**

Estos ensayos se realizaron en cámaras de Transwell de poro de 8 µm (Costar Corp.) recubiertas de GEL 1%. Aproximadamente 40x10<sup>3</sup> ECs se plaquearon en las cámaras de Transwell en medio sin suero (HE-SFM) y se indujo así su migración durante 6 horas (HUVEC) o 16 horas (MLEC) con bradikinina o distintos donadores de NO (1µM de bradikinina, 100µM de DEA-NONOato o DETA-NONOato) en la cámara superior o hacia las quimioquinas CCL2 o CXCL12 (10nM) en la cámara inferior del Transwell. El número de células migradas se contó tras fijar y teñir las células con 0.2% cristal violeta 2% etanol y eliminar las células de la cámara superior. En los casos de tratamiento con anticuerpos bloqueantes anti-MT1-MMP o anticuerpo control (10-15µg/ml) las células se preincubaron durante 15 minutos antes de ser plaqueadas. Los experimentos se realizaron por duplicado y se contaron cuatro campos de cada *transwell* con un objetivo de 40x en un microscopio Eclipse TS100 (Nikon).

### **ENSAYOS DE ANGIOGÉNESIS *IN VITRO***

La matriz Matrigel (BD Matrigel<sup>TM</sup> Basement Membrane Matrix) se diluyó 1:1 en medio 199 incompleto y se plaquearon 80µl por pocillo de 96. Se dejó gelificar durante 30 min



a 37°C. Posteriormente, se plaquearon  $15 \times 10^3$  ECs (HUVEC o MLEC) sobre el Matrigel añadiendo distintos estímulos: 1µM de bradikinina, 100µM de DETA-NONOato, 10nM de CCL2 o CXCL12. El número de angiotubos formados se contó tras 6 horas de incubación a 37°C con objetivo de 40x en un microscopio Eclipse TS100 (Nikon). Los tubos capilares se definen como extensiones celulares que forman un entramado semejante a una malla. Cada punto del experimento se realizó por triplicado. Las ECs se preincubaron durante 15 minutos en los casos en que se usaron anticuerpos anti-MT1-MMP y anticuerpos control (15µg/ml) o L-NAME (1-3mM).

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se comparó la significación estadística de las muestras experimentales y control utilizando el test de la t de Student.

## RESULTADOS

MT1-MMP desempeña un papel importante en diversos procesos que tienen lugar durante la angiogénesis tales como la degradación de la matriz extracelular (ECM) y la migración endotelial (Langlois *et al.*, 2004), (Galvez *et al.*, 2001). La angiogénesis está regulada por múltiples factores solubles como el VEGF y por citoquinas y quimioquinas (Carmeliet, 2003), (Carmeliet, 2005a), (Carmeliet, 2005b). Algunos de estos factores son a su vez capaces de modular la función de MT1-MMP. Por ello decidimos comenzar nuestro estudio analizando la posible implicación de MT1-MMP en la angiogénesis inducida por distintos factores solubles.

### **1. Estudio de la implicación de MT1-MMP en la formación de angiotubos inducida por distintos factores angiogénicos *in vitro***

En estudios previos de nuestro grupo hemos caracterizado la implicación de MT1-MMP en el programa angiogénico inducido por ciertas quimioquinas como CCL2 o CXCL8; sin embargo, la función de MT1-MMP no es necesaria en todos los procesos angiogénicos, ya que la respuesta angiogénica inducida por otras quimioquinas como CXCL12 no requieren la función de esta metaloproteinasa (Galvez *et al.*, 2005). Por lo tanto, decidimos estudiar la posible implicación de MT1-MMP en la formación de tubos inducida por distintos factores angiogénicos. En concreto usamos varios factores de crecimiento (VEGF, EGF, FGF y PDGF- $\beta$ ) y citoquinas ó mediadores inflamatorios (IL-1 y LPS). CXCL12 (SDF-1) y CCL2 (MCP-1) se incluyeron ya que han sido descritas previamente por nuestro grupo como quimioquinas capaces de inducir respuestas angiogénica de forma independiente (CXCL12) o dependiente (CCL2) de MT1-MMP (Galvez *et al.*, 2005).

Para los ensayos de angiogénesis se usó el sistema de formación de angiotubos sobre Matrigel *in vitro* como se describe en Materiales y Métodos en células endoteliales humanas (HUVEC) y en células endoteliales de pulmón de ratón (MLEC). Como puede verse en la Figura 7, los factores de crecimiento (VEGF, EGF, FGF y PDGF- $\beta$ ) inducen la formación de tubos a 6 horas en ECs humanas. De los mediadores inflamatorios estudiados tan sólo el LPS inducía la formación de tubos a 6 horas y también las quimioquinas CCL2 y CXCL12 tenían un efecto potenciador de la formación de tubos a 6 horas. Sin embargo, a 24 horas se observó que

unicamente las células endoteliales tratadas con FGF, EGF y el LPS eran capaces de mantener dichos tubos. A este mismo tiempo es cuando se encontró un efecto activador de la IL-1.

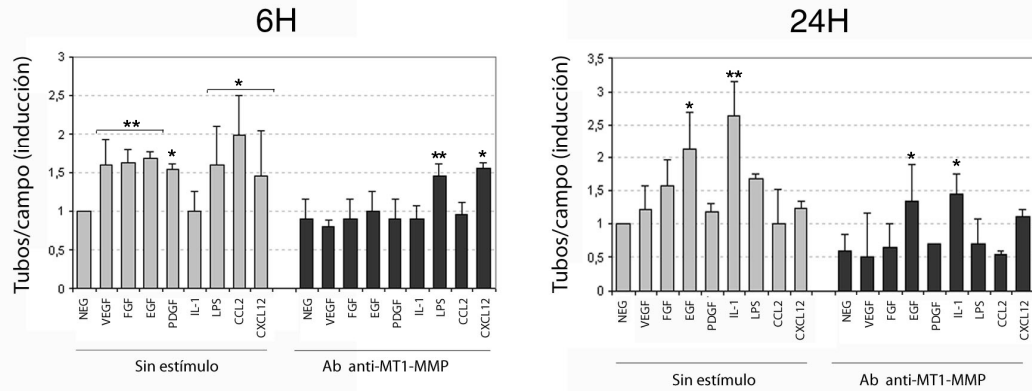
Para estudiar la función de MT1-MMP, las ECs humanas se pretrataron o no con el anticuerpo bloqueante de MT1-MMP LEM-2/15 (Galvez *et al.*, 2001) y se estudió el efecto en la formación de tubos inducida por los distintos estímulos. El anticuerpo anti-MT1-MMP disminuyó la formación de tubos capilares inducida por todos los factores de crecimiento (VEGF; EGF; FGF y PDGF- $\beta$ ), indicando que la actividad de MT1-MMP es necesaria para el programa angiogénico inducido por estos estímulos. Por otro lado, la formación de angiotubos en ECs humanas estimuladas con LPS, IL-1 y CXCL12 no se afectó por el tratamiento con el anticuerpo anti-MT1-MMP, indicando que estos estímulos estarían activando un programa proteolítico independiente de MT1-MMP. Para confirmar los datos obtenidos con los anticuerpos se usó un modelo experimental complementario. Se utilizaron MLEC procedentes de ratones de genotipo silvestre (*wild type* ó *WT*) o deficientes en MT1-MMP (*knock out* ó *KO*). En este caso no se realizaron experimentos a 24 horas ya que estas células tan sólo mantenían los tubos sobre Matrigel durante 8-10 horas. Los resultados fueron similares a los obtenidos en ECs humanas; todos los factores de crecimiento, ambas quimioquinas y LPS aumentaban la formación de tubos en las MLEC *wildtype*, y sin embargo únicamente CXCL12 y LPS eran capaces de inducir la formación de tubos en las MLEC deficientes en MT1-MMP. Estos datos corroboran la implicación de MT1-MMP en el programa angiogénico producido en respuesta a los factores de crecimiento VEGF, EGF, FGF y PDGF- $\beta$ , a IL-1 y a CCL2 y la existencia de vías independientes de MT1-MMP en el caso de LPS y CXCL12.

Los factores angiogénicos estudiados son capaces de inducir vías de señalización y mediadores solubles. En concreto, los factores de crecimiento VEGF, EGF, PDGF y FGF son conocidos moduladores de la sintasa de óxido nítrico endotelial, eNOS, y así de la producción de NO en el endotelio (Kondo *et al.*, 2004), (Murphy *et al.*, 2001).

Por ello, decidimos profundizar en la posible implicación del NO en la regulación funcional de MT1-MMP durante la respuesta angiogénica.

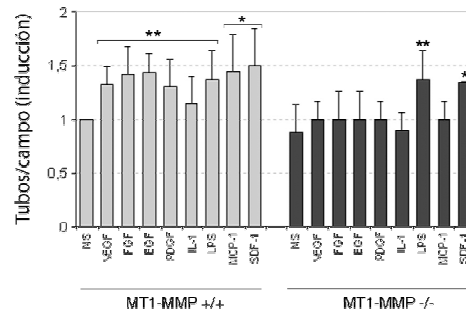
**A**

**HUVEC**



**B**

**MLEC**



**Figura 7. A) La formación de tubos inducida por distintos factores angiogénicos es dependiente de la función de MT1-MMP.** Se estudió la formación de tubos sobre Matrigel de ECs humanas (HUVEC) tratadas con distintos factores de crecimiento (10ng/ml EGF, 50ng/ml VEGF, 10ng/ml FGF, 30ng/ml PDGF), citoquinas y factores inflamatorios (5ng/ml IL-1, 50ng/ml LPS); como control de dependencia o independencia de MT1-MMP se emplearon las quimioquinas CCL2 ó CXCL12, a una concentración de 10nM. Estos ensayos se realizaron en presencia o no del anticuerpo bloqueante anti-MT1-MMP (10µg/ml). Se muestra la formación de tubos por HUVEC a 6 horas (**panel izquierdo**) y a 24 horas (**panel derecho**). **B)** A su vez, se realizaron experimentos complementarios en MLEC de ratones deficientes o no en MT1-MMP a 6 horas. En las gráficas se representan las medias y las desviaciones estándares (s.d.) de la inducción (FI) en la formación de tubos respecto a las ECs no estimuladas (*Neg*) de datos procedentes de n=3 experimentos independientes. El valor absoluto correspondiente a la FI=1 fue de 63 tubos/campo. \*\*, p< 0.03 ; \*, p< 0.05.

## **2. Caracterización de la regulación de MT1-MMP por el óxido nítrico (NO) en ECs humanas y murinas**

### **2.1 Regulación de MT1-MMP por el NO en ECs humanas**

#### **2.1.1 Localización subcelular de MT1-MMP, eNOS y el NO**

Experimentos realizados previamente en nuestro grupo (Galvez *et al.*, 2002), (Galvez *et al.*, 2004) describen la existencia de un mecanismo de regulación de la localización subcelular de MT1-MMP en función de la ECM. En situación de confluencia celular sobre determinadas matrices como colágeno tipo I (COL I), fibronectina (FN) o fibrinógeno (FG), MT1-MMP se enriquece en los contactos intercelulares, donde se encuentra asociada con integrinas  $\beta 1$ . Esta localización de MT1-MMP en los contactos célula-célula se correlaciona con una disminución de su actividad proteolítica (Galvez *et al.*, 2002). Puesto que la actividad de eNOS también puede regularse por su localización, quisimos estudiar si la localización de ambas proteínas podría verse regulada por la ECM de forma similar. Para ello, analizamos la distribución de ambas proteínas en situación de confluencia celular sobre distintas matrices tanto por inmunofluorescencia como por fraccionamiento subcelular en gradiente de flotación. En el panel inferior de la Figura 8 A se puede apreciar que ambas proteínas están presentes en fracciones correspondientes a las fracciones positivas para caveolina-1, tanto sobre GEL como sobre COL I, como se ha descrito previamente (Galvez *et al.*, 2004), (Shaul *et al.*, 1996). Además, cuando las ECs se crecen sobre GEL, tanto MT1-MMP como eNOS se localizan principalmente en citosol (Figura 8 A, panel inferior, fracciones 1-3, positivas para tubulina). De forma similar, ambas proteínas presentan una localización difusa en el citosol por inmunofluorescencia (Figura 8 A, panel superior). Sin embargo, sobre COL I, se aprecia una relocalización de eNOS y MT1-MMP a los contactos célula-célula, en contraste con la localización difusa por el citosol observada sobre GEL (panel superior de la Figura 8 A). Este reclutamiento visualizado por inmunofluorescencia se observa igualmente en el fraccionamiento subcelular: ambas proteínas se reclutan en fracciones de membrana no caveolares, correspondientes a los contactos celulares (fracciones 4-6, positivas para VE-cadherina, proteína localizada principalmente en contactos celulares (Cavallaro *et al.*, 2006)). No obstante, a diferencia de MT1-MMP, no toda la eNOS celular sigue este patrón de regulación.

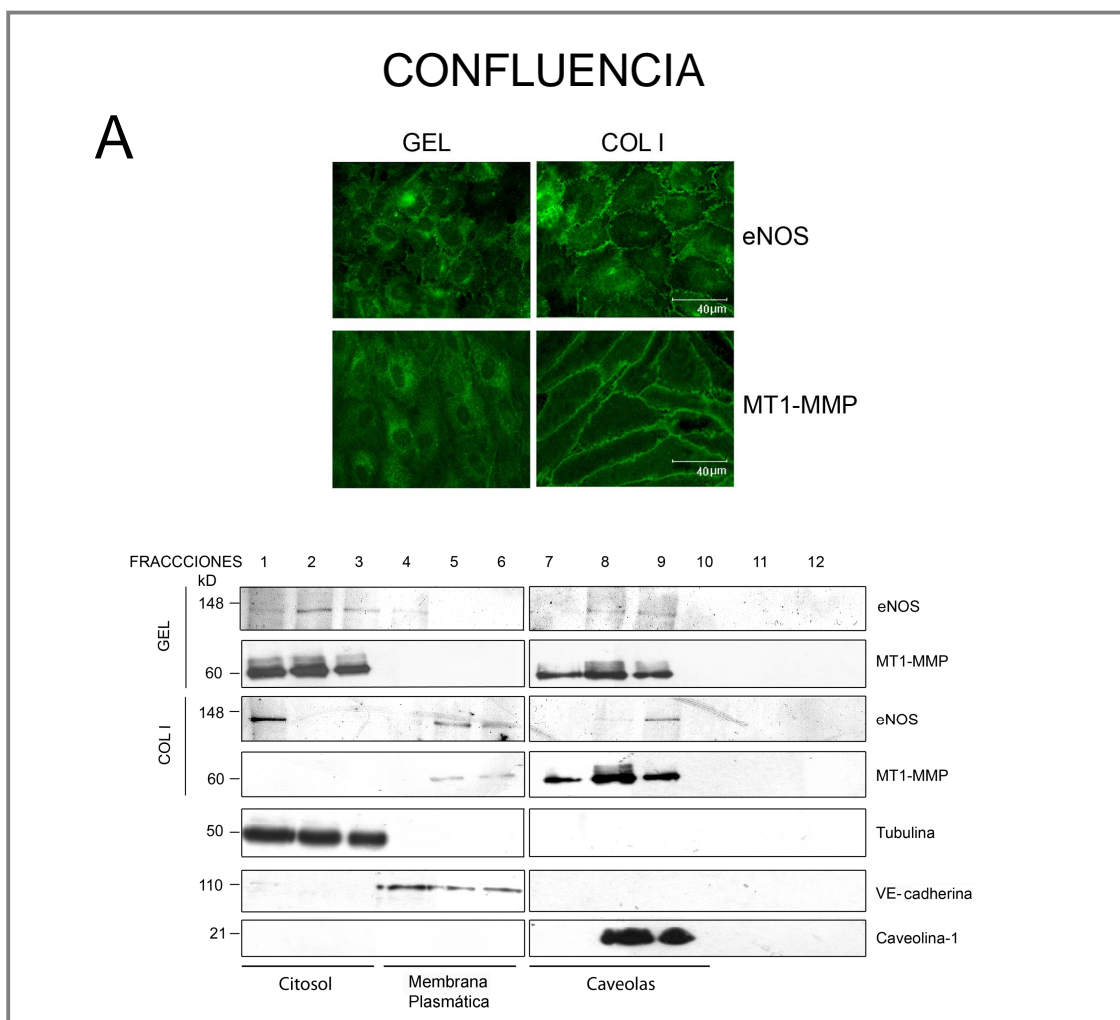
Estos resultados apuntan a la existencia de mecanismos de regulación similares para ambas proteínas en el mantenimiento de la homeostasis del endotelio quiescente.

Sin embargo, a diferencia del estado de confluencia celular, durante la migración tanto eNOS como MT1-MMP son reclutadas a las estructuras móviles de la célula de forma

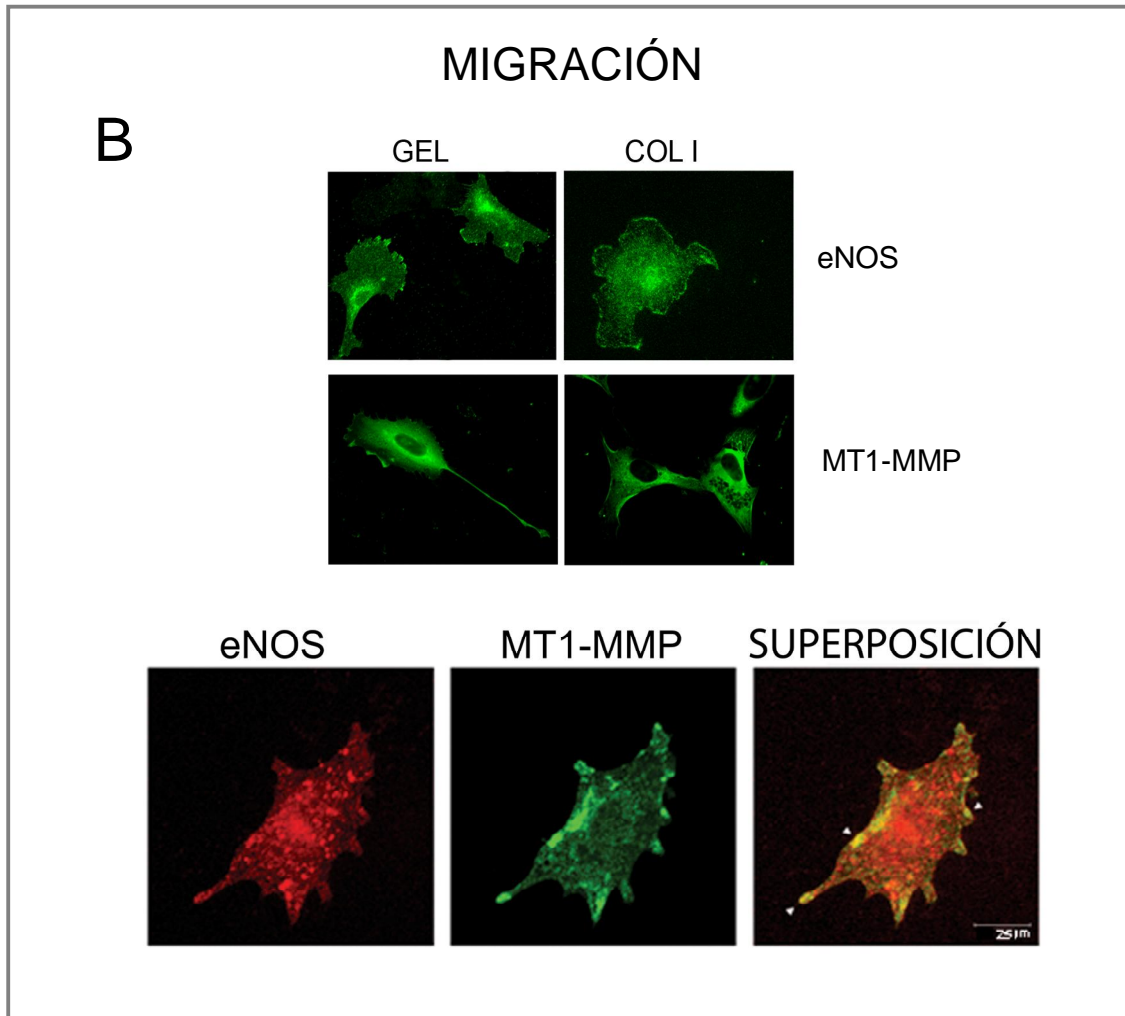
independiente de la ECM (panel superior de la Figura 8 B y (Galvez *et al.*, 2002)). Como se ha descrito previamente en nuestro grupo, esta movilización de MT1-MMP a dichas estructuras móviles, como son los *filopodia* y *lamellipodia*, se produce conjuntamente con caveolina-1 e integrinas  $\alpha\beta 3$  y se traduce en un aumento de actividad de MT1-MMP durante la migración endotelial (Galvez *et al.*, 2001), (Galvez *et al.*, 2002), (Galvez *et al.*, 2005).

Puesto que tanto MT1-MMP como el NO presentan un papel fundamental en la migración endotelial (Zhou *et al.*, 2000), (Galvez *et al.*, 2001), (Galvez *et al.*, 2005), (Hood *et al.*, 1998), (Morbideilli *et al.*, 1996), (Murohara *et al.*, 1998a), (Noiri *et al.*, 1998), y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la Figura 7, decidimos centrar nuestro estudio en la regulación de MT1-MMP por el NO durante la migración endotelial.

En primer lugar, analizamos la localización de eNOS y MT1-MMP a estructuras móviles durante la migración por microscopía confocal. Este estudio reveló que ambas proteínas colocalizan mayoritariamente en estas protrusiones de membrana asociadas a la migración. En el panel inferior de la Figura 8 B se muestran las tinciones de eNOS (rojo) y MT1-MMP (verde) y las áreas de colocalización en los *filopodia* y *lamellipodia* en amarillo.



**Figura 8A. La localización de eNOS y MT1-MMP está regulada de forma similar.** Se crecieron ECs en confluencia sobre matrices de GEL o COL I y la distribución de MT1-MMP y eNOS se estudió por inmunofluorescencia (**panel superior**). En el **panel inferior** se crecieron ECs sobre GEL y COL I hasta alcanzar la confluencia y se realizó un fraccionamiento subcelular en gradiente de flotación a partir de los lisados celulares. Las distintas fracciones recogidas se resolvieron en geles SDS-PAGE y posteriormente se analizó la distribución subcelular de las distintas proteínas por *western blot*.



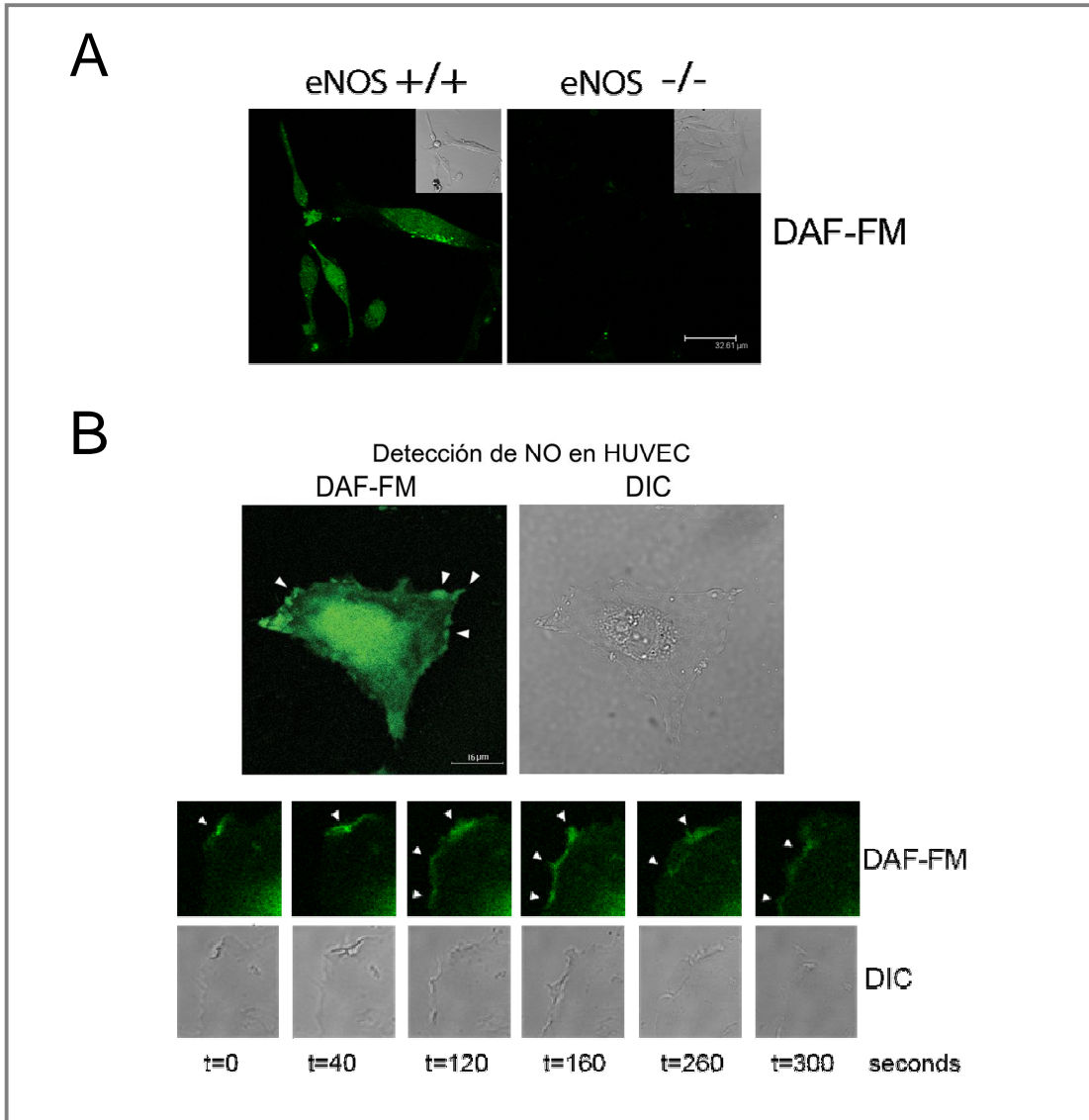
**Figura 8B.** La localización de eNOS y MT1-MMP está regulada de forma similar y ambas proteínas colocalizan en estructuras móviles celulares durante la migración. Se crecieron ECs sobre matrices de GEL o COL I en subconfluencia y se estudió la distribución de MT1-MMP y eNOS por inmunofluorescencia (**panel superior**). eNOS y MT1-MMP colocalizan en estructuras móviles de la célula durante la migración de ECs humanas. La localización de eNOS (rojo) y MT1-MMP (verde) se visualizó por inmunofluorescencia, y la colocalización (amarillo) se analizó por microscopía confocal (**panel inferior**).



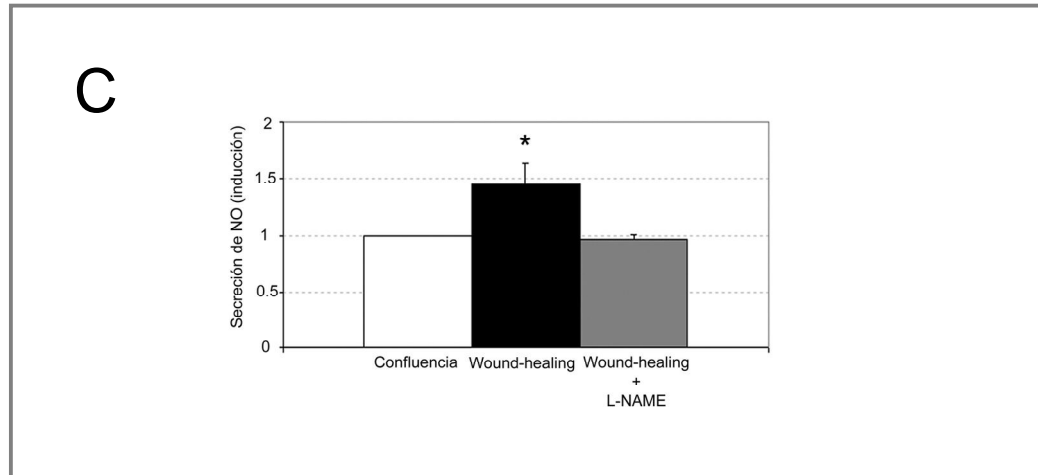
Teniendo en cuenta que la migración induce la localización de MT1-MMP a estas protrusiones de membrana asociadas a motilidad celular así como su actividad (Galvez *et al.*, 2001), y que la localización de eNOS parece estar regulada por la migración de forma similar, nos planteamos la posibilidad de que la migración también pudiera estar induciendo la actividad de eNOS en estas estructuras. En este sentido, analizamos la producción local de NO detectándolo con la sonda DAF-FM, que es capaz de reaccionar con el NO formando un compuesto fluorescente. La especificidad de esta técnica se analizó cargando con esta misma sonda MLEC procedentes de ratones deficientes en eNOS, incapaces de producir NO. La tinción con DAF-FM mostró producción de NO en MLEC WT, mientras que en MLEC deficientes en eNOS no se detectó señal específica (Figura 9 A). De igual manera visualizamos la producción de NO en HUVEC en migración y como se aprecia en el panel superior de la Figura 9 B, el NO sintetizado en respuesta a la migración estaba siendo producido y se localizaba principalmente en los *filopodia* y *lamellipodia* de la membrana celular. A su vez, realizamos un seguimiento de la producción de NO en HUVEC durante la migración mediante ensayos de microscopía en tiempo real. Estos experimentos nos mostraron que la producción del NO ocurre de forma local a lo largo de la membrana celular durante la migración celular. Esta producción localizada de NO ocurría de forma dinámica, con focos de producción que aparecían y desaparecían en períodos de tiempo muy cortos, como se aprecia en el panel inferior de la Figura 9 B y en el vídeo (ver cd adjunto).

Posteriormente estudiamos si el NO producido durante la migración era capaz de liberarse al medio extracelular y para ello indujimos la migración de las ECs humanas siguiendo el modelo de *wound-healing* y medimos la liberación de NO al medio extracelular. En la Figura 9 C se puede observar que durante los primeros 30 minutos la migración induce un aumento en la producción de NO respecto a las ECs en confluencia. Por otro lado, tratamos las ECs durante 1 hora con el inhibidor de la síntesis de NO, L-NAME, antes de inducir la migración. En esta condición, el aumento de producción de NO inducido por la migración se veía bloqueado, lo que indicaba que eNOS estaba siendo activada por la migración.

El hecho de que eNOS y MT1-MMP, ambas directamente implicadas en la migración celular, estén localizadas en las mismas protrusiones de membrana junto con la observación de que ambas proteínas se encuentran activadas en estas estructuras asociadas a motilidad celular nos llevó a pensar en una posible interrelación funcional entre eNOS y MT1-MMP durante esta fase de la angiogénesis.



**Figura 9A y B. eNOS está activa en protrusiones de membrana asociadas a motilidad celular donde produce NO.** **A)** La producción de NO se visualizó cargando células con la sonda de NO, DAF-FM. La especificidad de esta sonda se analizó en MLEC de genotipo silvestre o deficientes en eNOS. **B)** La producción de NO en HUVEC en migración se visualizó, mediante tinción con DAF-FM, en protrusiones celulares (**panel superior**). Se realizaron ensayos en tiempo real y se localizó la producción de NO en *lamellipodia* de ECs en migración, indicado por puntas de flecha. Se muestra un experimento representativo de tres realizados (**panel inferior**).



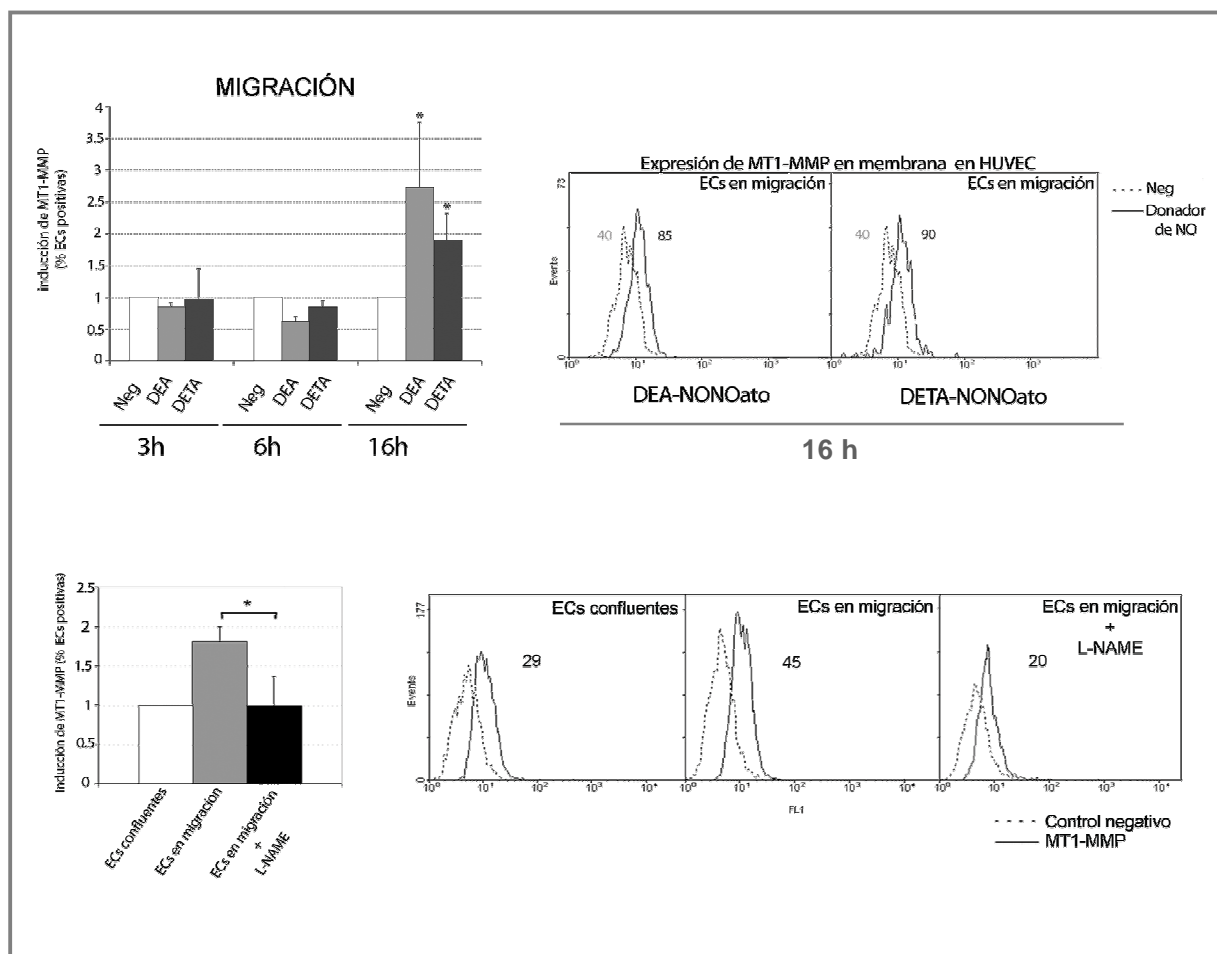
**Figura 9C. Las ECs humanas liberan NO durante la migración.** Las HUVEC se pretrataron o no con L-NAME durante 1 hora. La migración se indujo por disrupción de la monocapa celular y se midió la producción de NO como nitritos liberados al medio extracelular de células en confluencia o en migración (*wound-healing*) durante 30 minutos. La gráfica muestra la media y la s.d. (desviación estándar) de la FI respecto a la liberación de ( $\text{NO}_2^-$ ) de tres experimentos independientes realizados por triplicado. El valor absoluto correspondiente a FI=1 era de 307nM. \*,  $p<0.04$ .

### 2.1.2 Regulación de la distribución subcelular y actividad colagenolítica de MT1-MMP por el NO durante la migración endotelial

Con objeto de profundizar en el estudio de esta posible interrelación entre eNOS y MT1-MMP durante la migración endotelial, decidimos investigar si el NO podía estar regulando la expresión o actividad de MT1-MMP en células humanas en migración. Para ello, primero analizamos por citometría de flujo la expresión en la membrana celular de MT1-MMP en HUVEC en migración (subconfluentes o mediante la técnica de *wound-healing*) tratadas con distintos donadores de NO (DEA-NONOato y DETA-NONOato) a distintos tiempos (3, 6 y 16 horas). Como se aprecia en la Figura 10 (panel superior) sólo los tratamientos a 16 horas produjeron un aumento significativo en el porcentaje de células que expresan MT1-MMP en la membrana celular respecto a la expresión en ECs no tratadas. Como control se analizó la expresión del marcador endotelial CD31, cuya expresión no se vio modificada por los

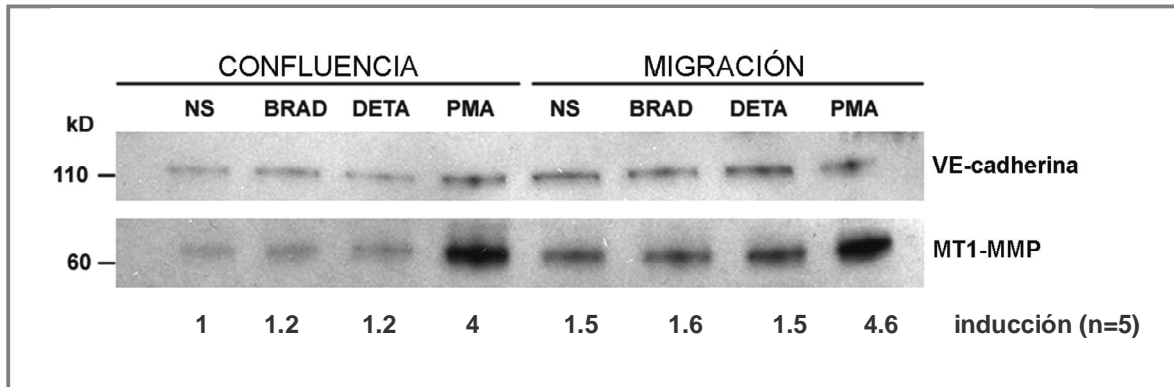
tratamientos con los donadores de NO (no se muestra). Sin embargo, este aumento del porcentaje de células que expresan MT1-MMP en la membrana celular inducido por los donadores de NO no se producía cuando se trataban ECs en confluencia, lo que sugiere que el NO estaría regulando la expresión de MT1-MMP en membrana sólo en situación de migración celular y tras tiempos de estimulación prolongados.

Además analizamos la expresión de MT1-MMP por citometría de flujo en ECs tratadas con el inhibidor de la síntesis de NO L-NAME durante 16 horas. En el panel inferior de la Figura 10 se muestran los perfiles de citometría en los que se aprecia el incremento de MT1-MMP en la membrana celular inducido por la migración (migración *versus* confluencia), descrito previamente (Galvez *et al.*, 2001). El bloqueo de producción de NO endógeno debido al tratamiento con L-NAME, inhibía dicho aumento de MT1-MMP en la membrana que ocurre en respuesta a la migración, sugiriendo que el NO podría estar modulando los niveles de MT1-MMP en membrana.



**Figura 10. El NO modula la expresión de MT1-MMP en membrana en ECs en migración.** En el **panel superior** se estudió por citometría de flujo la expresión en membrana de MT1-MMP en ECs en migración tratadas con distintos donadores de NO, DEA-NONOato o DETA-NONOato 100µM (durante 3, 6 y 16 horas). Las medias y las s.d. de la FI del porcentaje de células positivas para MT1-MMP se muestra en la gráfica. \*,  $p < 0.03$ , comparado con las células sin tratar (Neg). En el panel derecho se muestran perfiles de citometría a 16 horas representativos de tres experimentos independientes, en los que se indica el porcentaje de células positivas. En el panel inferior se estudió el efecto del L-NAME 500µM en la expresión de MT1-MMP en membrana. Se muestran las medias y s.d. del porcentaje de células positivas para MT1-MMP (**izquierda**) de tres experimentos independientes. \*,  $p < 0.02$  comparado las células sin tratar (Neg) y los perfiles representativos (**derecha**)

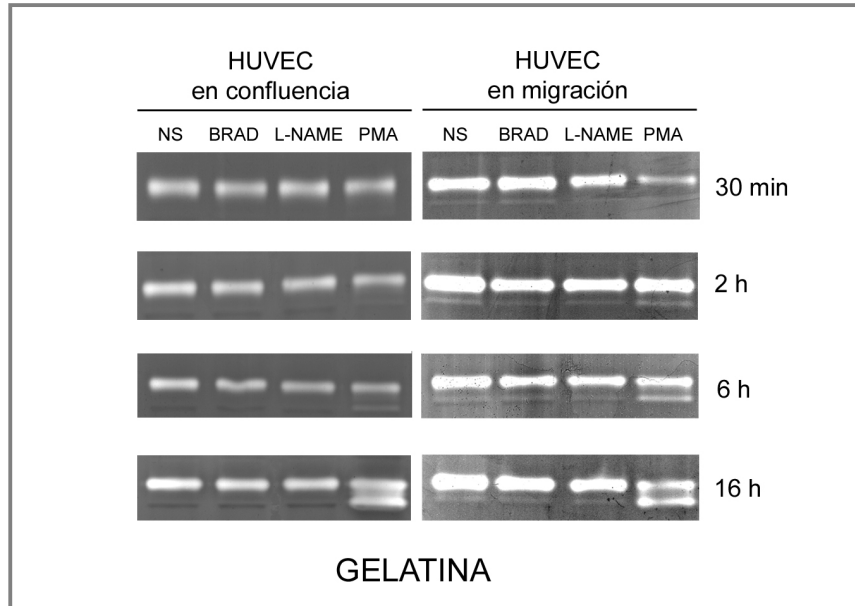
Analizamos entonces la expresión de MT1-MMP total en lisados de células tratadas con donadores de NO o con el activador de eNOS, bradikinina, en confluencia y migración. Como control positivo las células se trataron con PMA, que aumenta la expresión de MT1-MMP tanto en confluencia como en migración, como se ha descrito previamente (Galvez *et al.*, 2001). El análisis por *western blot* de la expresión de MT1-MMP total no mostraba variaciones significativas en la cantidad de MT1-MMP en respuesta al NO (Figura 11). Estos datos sugieren que la regulación de MT1-MMP en membrana a tiempos largos por el NO no se estaría produciendo a nivel de la aumento en la cantidad total de la proteína, si no que el NO debería estar regulando los niveles de MT1-MMP en la membrana celular mediante mecanismos alternativos (Figura 11).



**Figura 11. El NO no altera la cantidad de MT1-MMP total.** Se trataron HUVEC confluentes o en migración con DETA-NONOato 100 $\mu$ M o bradikinina 1 $\mu$ M durante 16 horas y la expresión de MT1-MMP se analizó por *western blot* en lisados celulares. Se incluyó PMA (20ng/ml) como control de activación y VE-cadherina como control de carga.

Estudiamos entonces si la modulación de MT1-MMP por el NO en la membrana celular se correlacionaba con una regulación en su actividad. Para ello, indujimos la producción de NO estimulando HUVEC con bradikinina y sus lisados se resolvieron en geles de SDS-PAGE que contenían GEL para analizar la actividad de MT1-MMP a través de la activación de pro-MMP2 (Figura 12). A su vez se realizaron experimentos similares con fibrinógeno (FG) con objeto de determinar la actividad fibrinolítica de MT1-MMP (no se muestra). En estos ensayos no se detectaron diferencias en la actividad proteolítica de MT1-MMP en células estimuladas con

bradikinina, indicando que el NO no era capaz de aumentar la actividad de MT1-MMP al menos de forma global. Tampoco se detectó ningún efecto con el inhibidor de la producción de NO, L-NAME.

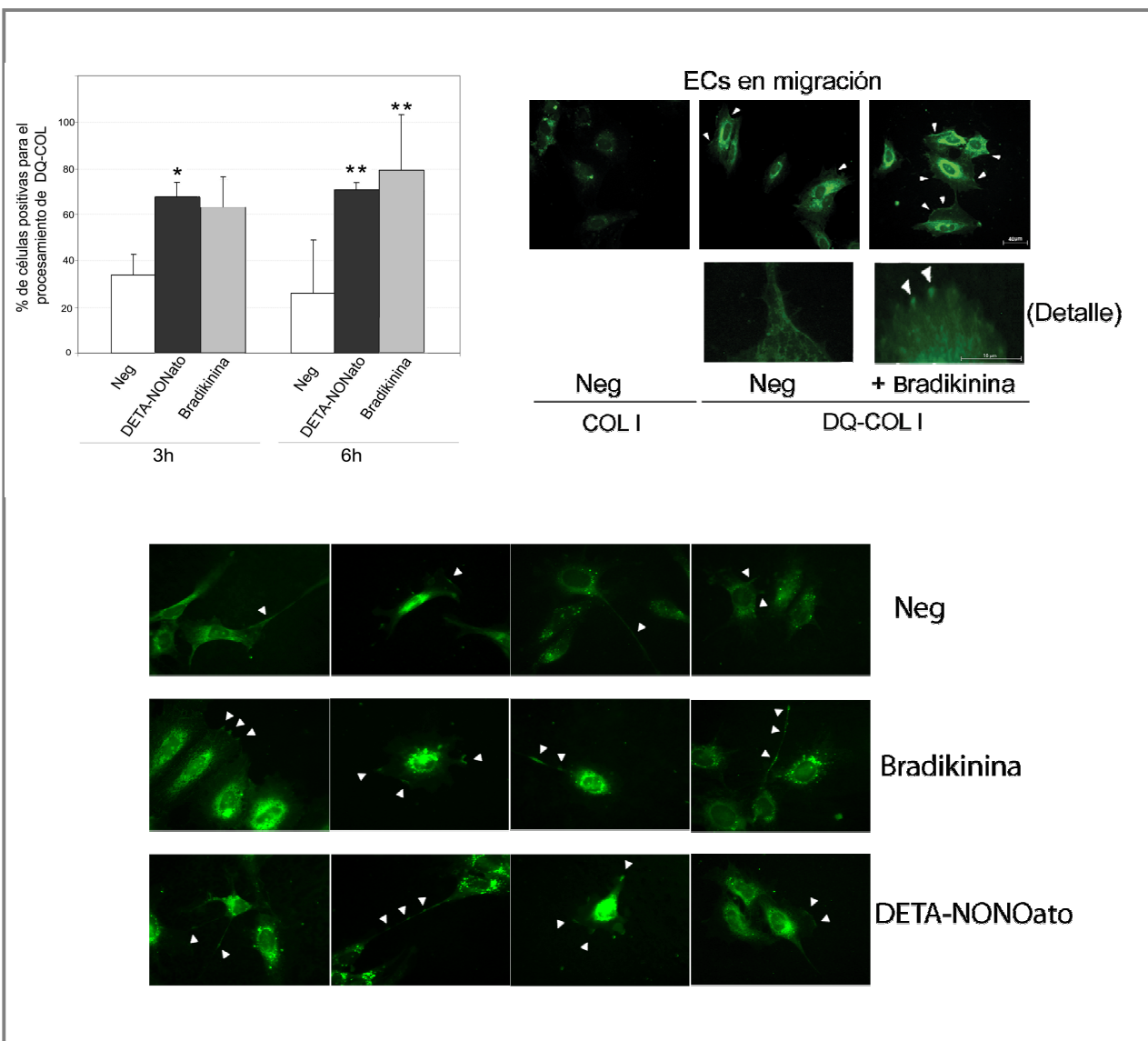


**Figura 12. El NO no modula la actividad total de MT1-MMP en lisado celular.** Se crecieron HUVEC hasta alcanzar la confluencia y se indujo la migración por disrupción de la monocapa (*wound-healing*) durante distintos tiempos estimulando a la vez con bradikinina 1μM, L-NAME 1mM o PMA 20ng/ml. Las células se lisaron directamente en Laemmli y se analizó su actividad gelatinolítica por zimografía en geles SDS-PAGE con 1mg/ml GEL. Los geles se tiñeron y posteriormente se destiñeron, revelando así las áreas de gelatinolisis como bandas blancas.

Se sabe que el NO actúa de forma localizada en la célula para modular distintos fenómenos como la exocitosis (Meffert *et al.*, 1996), (Lowenstein, 2007). Por lo tanto, si la regulación de la actividad de MT1-MMP se estuviera produciendo en sitios localizados de la membrana celular, es improbable que dicha regulación se detectara en lisados celulares totales. Por lo tanto, decidimos analizar la actividad de MT1-MMP mediante un abordaje diferente. Puesto que MT1-MMP se ha descrito previamente como la principal colagenasa en células endoteliales (Chun *et al.*, 2004), decidimos analizar su actividad local mediante ensayos de degradación de COL I en la membrana celular *in situ* en células vivas. Las ECs humanas se

plaquearon en subconfluencia sobre DQ-COL I, matriz que emite fluorescencia una vez que es procesada. Se plaquearon ECs sobre COL I en paralelo como control y únicamente se observó señal inespecífica en estos casos (Figura 13, panel superior). En este mismo panel de la Figura 13 se muestra cómo la migración *per se* es capaz de inducir la degradación del DQ-COL I, que puede apreciarse como zonas de fluorescencia verde en los *filopodia* y *lamellipodia* de la membrana celular (panel superior, derecha). Cuando las ECs se trataban con donadores de NO o con bradikinina la degradación de DQ-COL I aumentaba significativamente a intervalos de tiempo entre 1 y 6 horas (panel superior, izquierda). Sin embargo, a tiempos más largos no se detectaron cambios de actividad respecto a las células no estimuladas.

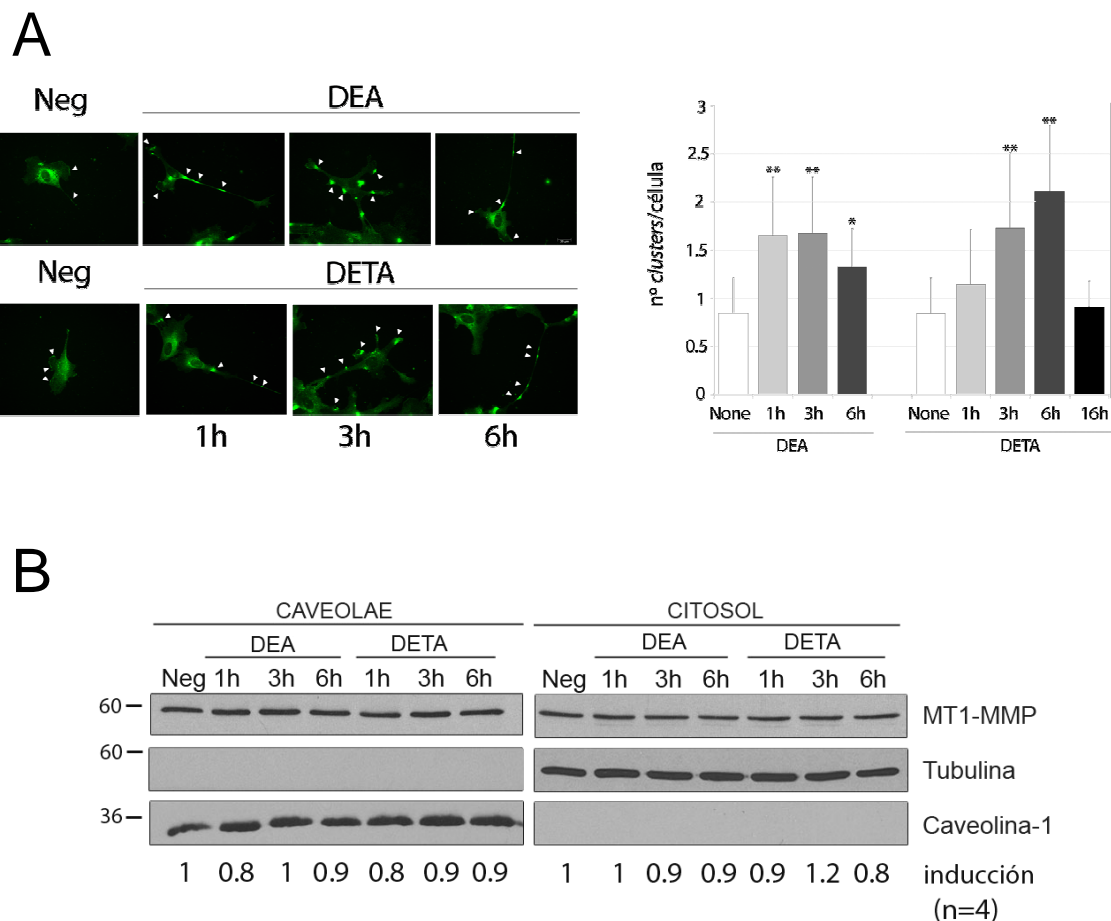




**Figura 13. El NO aumenta la actividad colagenolítica en la membrana celular de ECs humanas en migración.** Las HUVEC se palquearon sobre 10µg/ml de COL I o DQ-COL I en subconfluencia y se estimularon o no (*Neg*) con 100µM de DETA-NONOato o 1µM de bradikina durante 3 o 6 horas. En la gráfica se representan las medias y las s.d. del porcentaje de células positivas para la degradación de DQ-COL (n=40 células de media por condición). \*, p<0.05; \*\*, p<0.02 (**panel superior**). La degradación se visualizó como áreas fluorescentes en las protrusiones celulares, indicadas por puntas de flechas. En las fotografías se puede observar cómo aumenta el número de áreas fluorescentes en la membrana celular. En el **panel inferior** se muestran distintos ejemplos del aumento de actividad colagenolítica de MT1-MMP inducidos por la bradikina o el DETA-NONOato.

Esta regulación de la activación focal de MT1-MMP en membrana por el NO a tiempos cortos (3 y 6 horas), en los que no se encontraban efectos en la expresión de la proteasa en la superficie celular, sugieren que el NO podría modular la distribución de MT1-MMP a lo largo de la membrana celular de forma local y dinámica. Para analizar esta hipótesis estudiamos la localización de MT1-MMP por inmunofluorescencia en células tratadas con donadores de NO a distintos tiempos. En estos ensayos encontramos que tanto el DEA-NONOato como el DETA-NONOato incrementaban la cantidad de MT1-MMP en zonas discretas de la membrana celular (*clusters*) de ECs en migración. Este aumento ocurría de forma significativa a 1, 3 y 6 horas con el DEA-NONOato y a 3 y 6 horas con el DETA-NONOato, correspondiendo con los distintos perfiles de liberación de NO de estos donadores (rápida para el DEA-NONOato y lenta para el DETA-NONOato). Sin embargo, el patrón de MT1-MMP en membrana era similar en células no tratadas y tras 16 horas de estimulación, de forma paralela a lo que ocurre con la actividad de la proteasa (Figura 14 A).

Para profundizar en el posible mecanismo de regulación de la acumulación en membrana de MT1-MMP inducido por el NO, estudiamos su distribución por fraccionamiento subcelular. Para ello, se aislaron fracciones caveolares (solubles en Tritón X-114) y citosólicas de ECs tratadas con DEA-NONOato y DETA-NONOato a distintos tiempos (1, 3, y 6 horas) y se analizó la distribución de MT1-MMP por *western blot* (Figura 14 B). La distribución de MT1-MMP era similar en células no tratadas y tratadas con los distintos donadores y no se detectaron cambios significativos en su compartimentalización. En conjunto, estos datos indican que el NO a tiempos cortos estaría produciendo una acumulación de MT1-MMP dinámica en zonas discretas de la membrana asociadas a motilidad celular, de forma que el NO estaría regulando, directa o indirectamente, la actividad de MT1-MMP en lugares específicos de la membrana celular durante la migración endotelial.

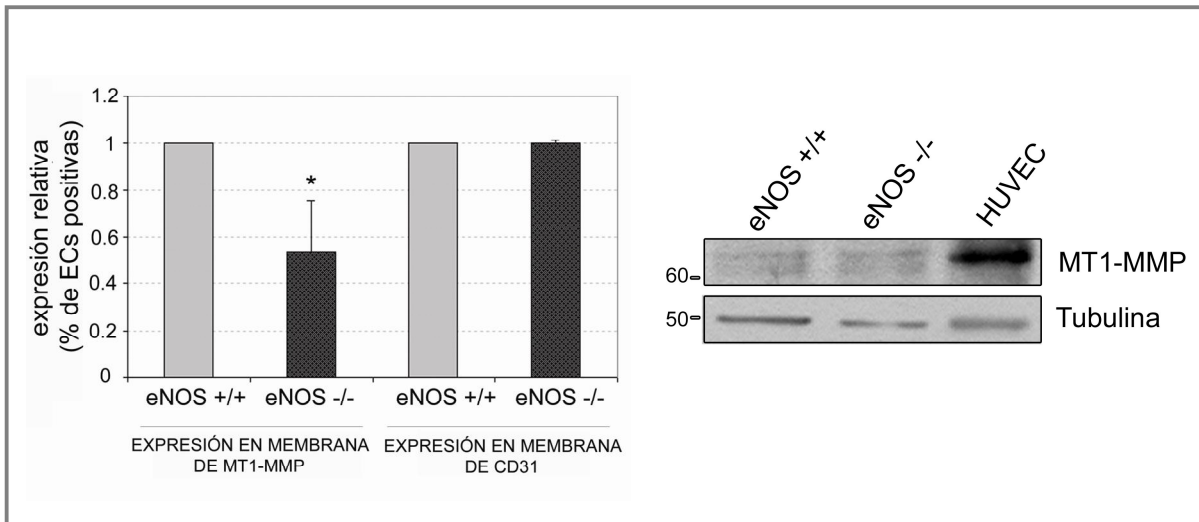


**Figura 14. El NO aumenta la acumulación de MT1-MMP en zonas discretas de protrusiones de la membrana celular. A)** Se trataron HUVEC en subconfluencia con DEA-NONOato o DETA-NONOato 100μM durante 1, 3 y 6 horas y la distribución de MT1-MMP se estudió por inmunofluorescencia. Los donadores de NO aumentan significativamente la acumulación de MT1-MMP en membrana (*clusters*) de 1 a 6 horas. En el panel derecho se muestran las medias y las s.d. del número de *clusters*/célula (n=80 células de media por condición) de 6 experimentos independientes. \*, p<0.04; \*\*, p<0.02. **B)** La compartimentalización de MT1-MMP en fracciones caveolares y citosólicas se estudió por aislamiento de dichas fracciones con Tritón X-114 en HUVEC tratadas con distintos donadores de NO. No se detectaron cambios significativos en la distribución de MT1-MMP.

## **2.2 Regulación de MT1-MMP por el NO en ECs murinas**

### **2.2.1 Regulación de la expresión, localización y actividad de MT1-MMP en ECs murinas en ausencia de NO**

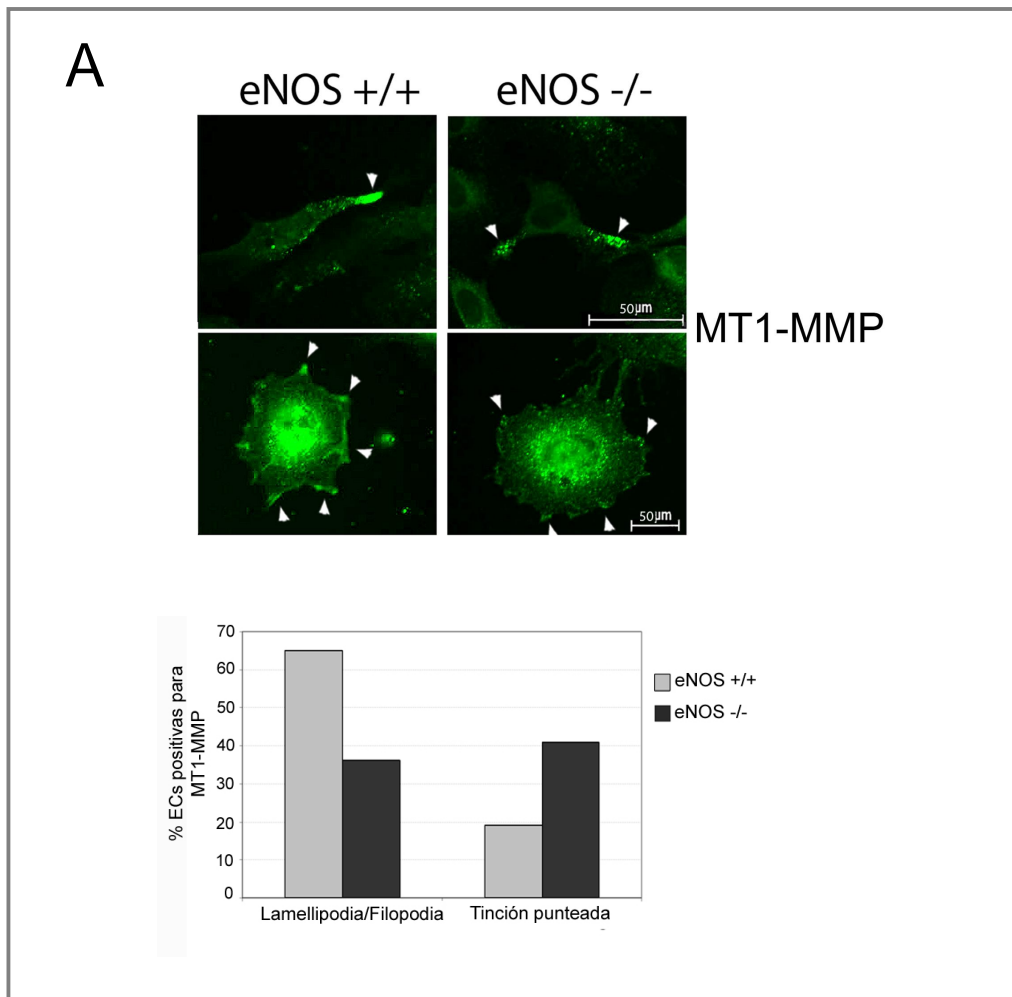
Según los datos obtenidos, el NO exógeno (liberado por los donadores de NO) y el NO endógeno producido en respuesta a bradikinina estarían regulando la distribución y actividad de MT1-MMP en la membrana de las ECs. Por ello, nos preguntamos si este NO podría estar afectando a la homeostasis funcional de MT1-MMP en un sistema celular en el que no se produjera NO. Como hemos mostrado anteriormente, las MLEC deficientes en eNOS son incapaces de producir NO (detección con DAF-FM, Figura 9, panel superior); de modo que usamos este sistema celular para caracterizar la regulación de MT1-MMP en ausencia de NO. Para ello, analizamos la expresión y localización de MT1-MMP en MLEC procedentes de ratones deficientes en eNOS o de genotipo silvestre. La expresión de MT1-MMP en la membrana celular se analizó por citometría de flujo y se observó que aproximadamente un 50% menos de las MLEC deficientes en eNOS expresaban MT1-MMP en la superficie celular, comparadas con las MLEC de genotipo silvestre, de forma similar a lo que ocurría en ECs humanas en presencia de L-NAME (Figura 10, panel inferior). Sin embargo, otras proteínas de membrana como el CD31 se expresaban de forma similar en ambos tipos celulares (Figura 15 panel izquierdo). Seguidamente analizamos la expresión de proteína total por ensayos de *western blot* en estos dos tipos celulares; en el panel derecho de la Figura 15 se puede observar que no se encontraron diferencias en la expresión de MT1-MMP total en lisados celulares entre las MLEC *WT* y las deficientes en eNOS. De nuevo estos resultados concuerdan con los obtenidos respecto a la expresión total de MT1-MMP en ECs humanas (Figura 11).



**Figura 15. Disminución en el porcentaje de ECs que expresan MT1-MMP en la superficie celular en ausencia de eNOS.** Se analizó la expresión de MT1-MMP en MLEC deficientes o no en eNOS en subconfluencia por citometría de flujo (**panel izquierdo**) y por *western blot* de lisados celulares totales (**panel derecho**). Como control de expresión en membrana se usó CD31 y como control de carga de los lisados celulares en el *western blot* se usó tubulina. En la gráfica se representa la media y la s.d. del porcentaje de células positivas de 5 experimentos independientes. \* $p < 0.01$  (versus *eNOS* +/+).

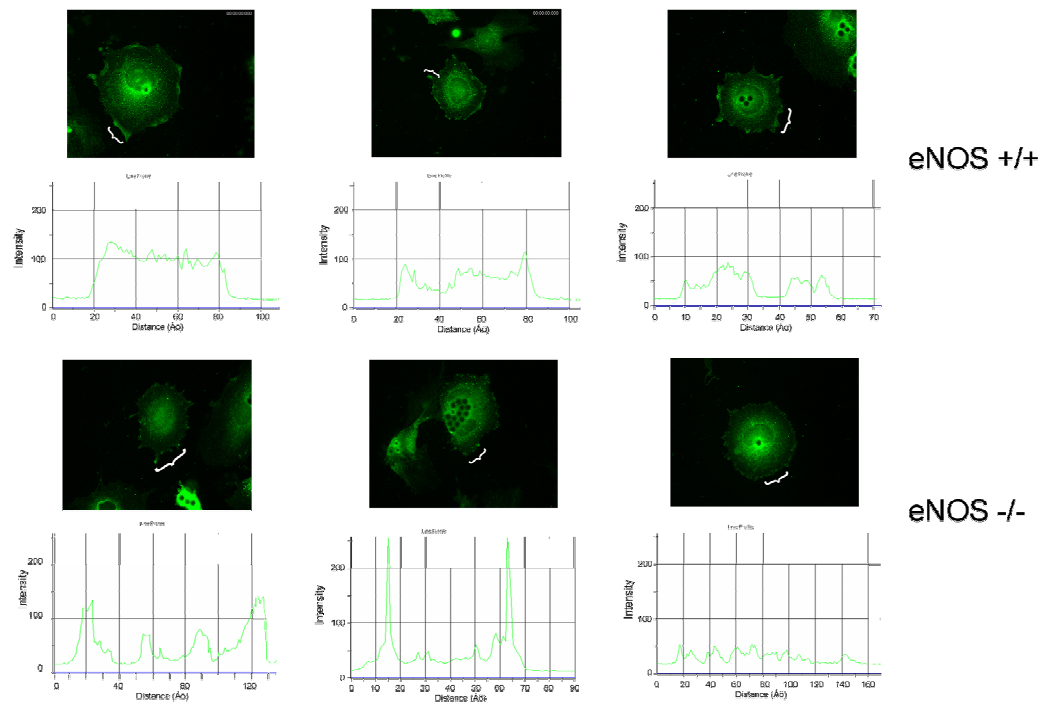
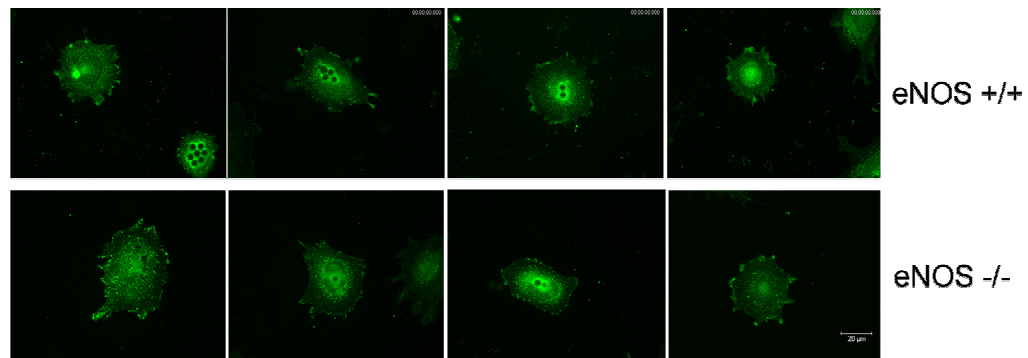
Posteriormente se estudió la localización de MT1-MMP por inmunofluorescencia (Figura 16 A, panel superior). MT1-MMP se encuentra localizada en protrusiones de membrana de MLEC en migración con independencia de la presencia o ausencia de eNOS. Sin embargo, el patrón de localización de MT1-MMP en membrana es ligeramente diferente en estos dos tipos celulares; en las células que expresan eNOS (genotipo silvestre o *WT*), se puede observar el patrón clásico de MT1-MMP en ECs acumulada en zonas discretas de los *filopodia* y *lamellipodia*, mientras que en las MLEC deficientes en eNOS se encontró que esta tinción típica de MT1-MMP estaba disminuida y que predominaba un patrón de localización de MT1-MMP más punteado. En el panel inferior de la Figura 16 A se puede ver que el porcentaje de células que expresan el patrón típico de MT1-MMP en los *filopodia* y/o *lamellipodia* es sustancialmente mayor en las MLEC que expresan eNOS (65%) que en las que no lo expresan (36%); por el contrario, las MLEC deficientes en eNOS presentan un mayor porcentaje de células con patrón punteado de MT1-MMP (42%) que las MLEC que sí expresan eNOS (19%). Para comparar cuantitativamente estas diferencias en el patrón de localización de MT1-MMP

realizamos análisis de los perfiles de intensidad de fluorescencia a lo largo de la membrana celular en ambos tipos celulares. Este análisis mostró que en las células que expresan eNOS el patrón de expresión de MT1-MMP mayoritario correspondía con perfiles de fluorescencia representados por picos anchos (acumulaciones de MT1-MMP o *clusters* grandes), mientras que en las células deficientes en eNOS la expresión de MT1-MMP se representaba como varios picos estrechos (patrón discreto y punteado) (Figura 16 B). Estos resultados indican que MT1-MMP puede expresarse en la célula independientemente de la presencia de eNOS, pero que la compartimentalización de MT1-MMP y su correcta localización en estructuras móviles de membrana requieren de alguna manera que eNOS esté presente en la célula.



**Figura 16A.** La acumulación de MT1-MMP en membrana está alterada en las MLEC deficientes en eNOS. La localización subcelular de MT1-MMP se visualizó por inmunofluorescencia en MLEC procedentes de ratones deficientes o no en eNOS (**panel superior**). Se cuantificó el porcentaje de células que mostraban una tinción típica de MT1-MMP en *filopodia* y *lamellipodia* en contraste con las que mostraban tinciones de MT1-MMP de tipo punteado (**panel inferior**).

B

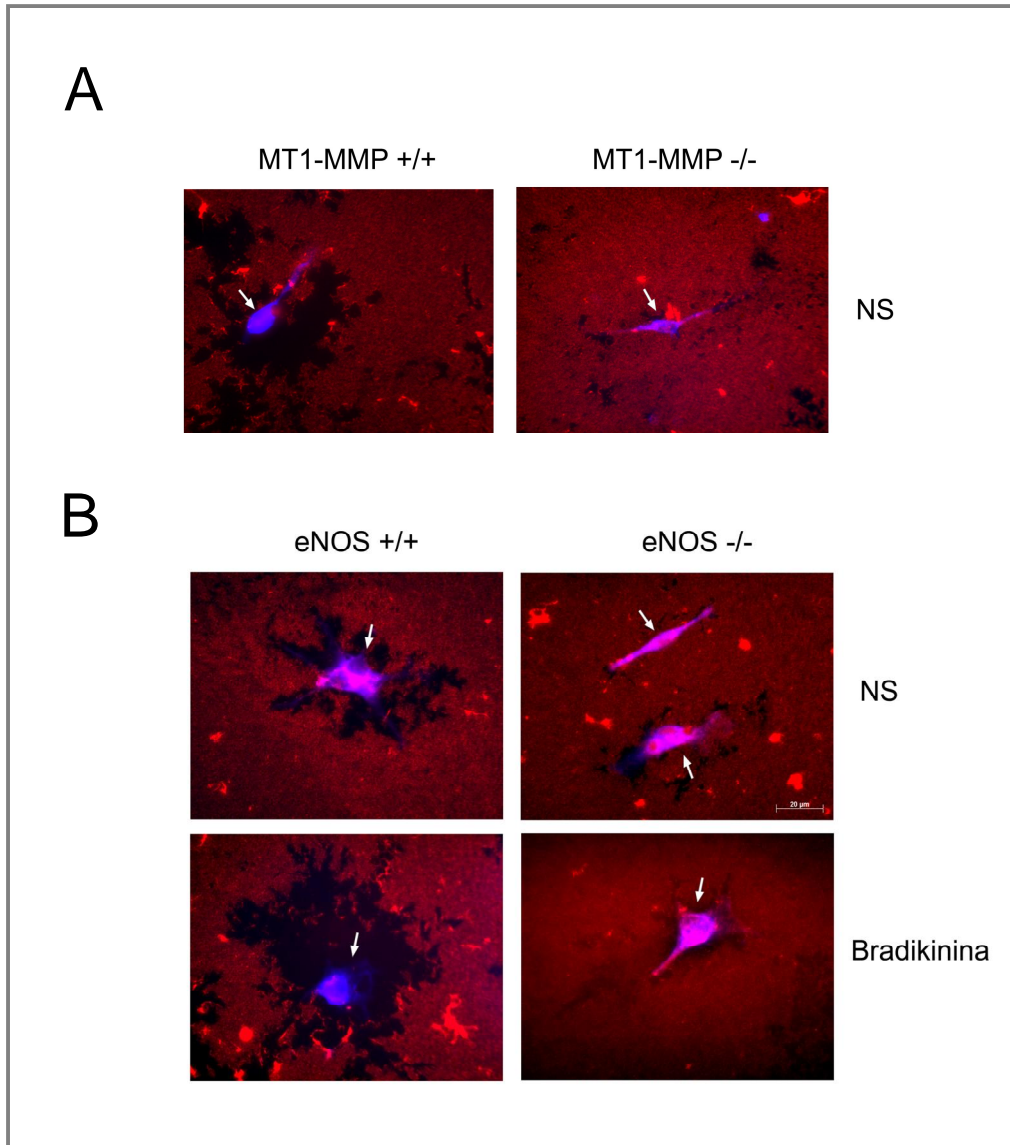


**Figura 16B.** La acumulación de MT1-MMP en membrana está alterada en las MLEC deficientes en eNOS. Se analizaron los perfiles de intensidad de fluorescencia en la membrana celular de ambos tipos celulares.

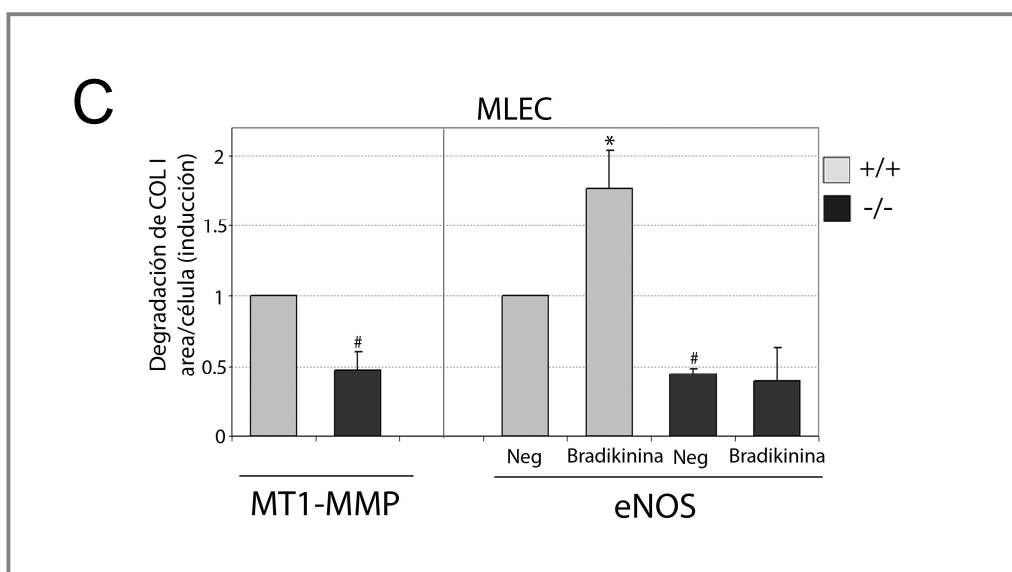


MT1-MMP ejerce su principal función como proteasa activa una vez se ha localizado en la membrana celular [Itoh, 2006 #234], y puesto que habíamos encontrado un defecto en la acumulación de MT1-MMP en ausencia de eNOS, el siguiente paso fue estudiar la actividad de MT1-MMP en estas mismas células. Como se ha comentado anteriormente, MT1-MMP es la principal colagenasa en ECs (Chun *et al.*, 2004). En este caso, la actividad colagenolítica de MT1-MMP se midió cuantificando las áreas de degradación de COL I. Como control de especificidad del ensayo se analizó la degradación de COL I en MLEC subconfluentes deficientes o no en MT1-MMP. Las MLEC que expresan MT1-MMP son capaces de degradar el COL I en respuesta a la migración (áreas oscuras), mientras que las MLEC deficientes en MT1-MMP apenas presentan áreas de degradación de COL I (Figura 17 A y 17 C). Analizamos entonces la actividad colagenolítica de MT1-MMP en MLEC en migración deficientes o no en eNOS. Los resultados mostraron que las MLEC deficientes en eNOS apenas eran capaces de degradar el COL I, en comparación con las de genotipo silvestre. Tratamos estas células con bradikinina durante 6 horas y solamente observamos aumento de la actividad colagenolítica de MT1-MMP en las células que expresan eNOS (17 B y 17 C). Estos resultados indican que la producción de NO endógeno es necesaria para la correcta degradación de COL I mediada principalmente por MT1-MMP. En la gráfica (Figura 17, panel C) se representa la cuantificación de las áreas de degradación de COL I en las distintas condiciones.

En conjunto, todos estos datos demuestran que MT1-MMP es capaz de sintetizarse y expresarse en la célula con independencia de la producción de NO pero sin embargo, necesita de la presencia de eNOS y por tanto, de la producción de NO, para poder localizarse, expresarse y activarse correctamente en la membrana celular. De esta manera, el NO es necesario para que se desarrolle la actividad colagenolítica de MT1-MMP, lo cual es indispensable, entre otros fenómenos, para que la célula endotelial pueda realizar funciones básicas durante la angiogénesis como la migración y la formación de vasos.



**Figura 17A y B. La producción de NO es necesaria para la degradación de COL I por MT1-MMP en MLEC.** A) Como control de especificidad de la degradación de COL I (áreas oscuras) se analizó la degradación de COL I en MLEC deficientes o no en MT1-MMP (**panel superior**). B) La actividad de MT1-MMP inducida por el NO se analizó cuantificando las áreas de degradación de COL I en MLEC *WT* y deficientes en eNOS (**panel inferior**).



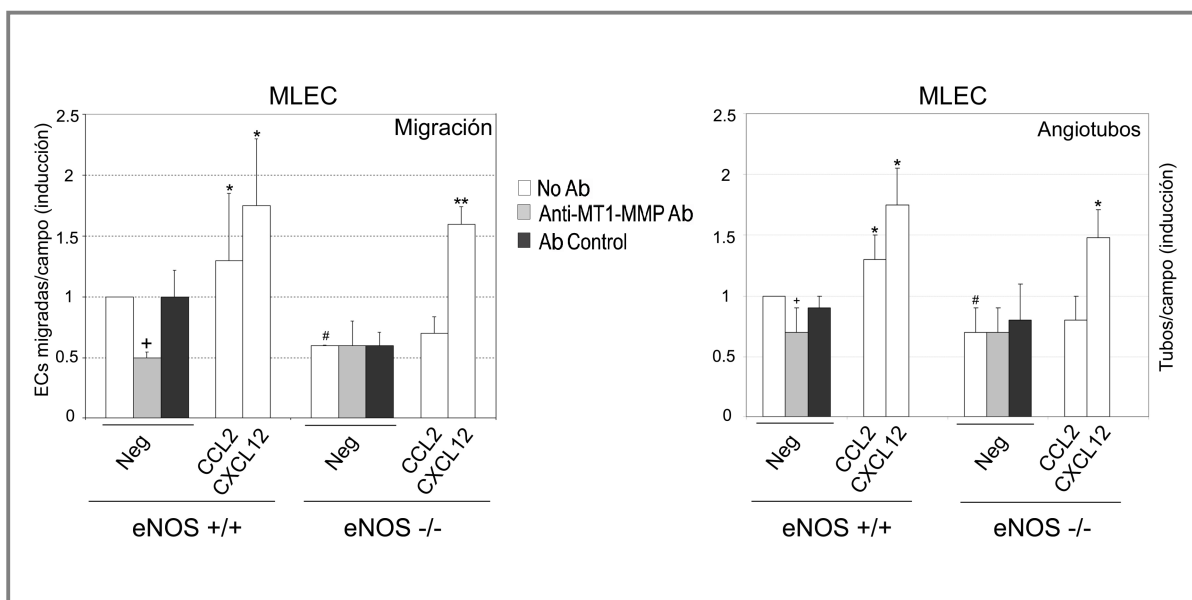
**Figura 17C. La producción de NO es necesaria para la degradación de COL I por MT1-MMP en MLEC.** En el histograma se muestra la media y s.d. de la cuantificación de las áreas de degradación de COL (FI) de *n* experimentos independientes (*n*= 5 para MT1-MMP y *n*=4 para eNOS). El valor absoluto correspondiente a FI=1 era de 94.5  $\mu\text{m}^2$ . #,  $p<0.01$  (versus +/+); \*,  $p<0.01$  (versus *Neg*).

### 2.2.2 Función de MT1-MMP en la migración endotelial y la formación de angiotubos en ausencia de eNOS

Teniendo en cuenta que en ausencia de expresión de eNOS, y por lo tanto de producción de NO, tanto la expresión, localización y la actividad en membrana de MT1-MMP se ven alteradas, y puesto que la actividad de MT1-MMP es imprescindible en la migración y formación de tubos por las ECs, nuestro siguiente objetivo fue analizar estos dos fenómenos en estas ECs incapaces de producir NO. Por lo tanto, realizamos experimentos de migración y formación de angiotubos en MLEC procedentes de ratones *WT* o deficientes en eNOS pretratadas o no con el anticuerpo bloqueante anti-MT1-MMP, LEM-2/63. Como se ha descrito previamente (Lee *et al.*, 1999), (Zhao *et al.*, 2002) las células deficientes en eNOS migran menos y forman menos tubos que las *WT* (Figura 18). En presencia del anticuerpo anti-MT1-MMP las MLEC *WT* disminuyen su capacidad de migración en un 50%, mientras que en las

MLEC deficientes en eNOS no se observó efecto alguno del anticuerpo anti-MT1-MMP. El anticuerpo control no modificó ni la migración ni la formación de tubos respecto al basal en ninguno de los dos tipos celulares. En los experimentos de migración el tratamiento con la quimioquina CCL2 aumentó significativamente la capacidad migratoria de las células *WT* y sin embargo no produjo ningún efecto en las células deficientes para eNOS, indicando que en ausencia de producción de NO la migración de estas células no responde a estímulos dependientes de la función de MT1-MMP. Por el contrario, el tratamiento con CXCL12, quimioquina independiente de MT1-MMP, aumentó de manera significativa la migración tanto en ausencia como en presencia de eNOS, y por consiguiente de síntesis de NO.

En los experimentos de formación de tubos, las células respondían de igual forma que en los ensayos de migración respecto al bloqueo de MT1-MMP con anticuerpos, que disminuye la formación de tubos en un 30%, y a los tratamientos con CCL2 y CXCL12. En conjunto, estos datos por un lado corroboran lo que han descrito previamente otros autores, que en ausencia de NO tanto la migración como la formación de tubos no pueden ocurrir de manera correcta, siendo así el NO necesario para estos procesos, pero además demuestran que la función de MT1-MMP en el desarrollo de estos dos procesos depende de la presencia del NO, ya que: 1) en ausencia de NO los anticuerpos bloqueantes anti-MT1-MMP no presentan efecto alguno y 2) la estimulación con quimioquinas que requieren la función de MT1-MMP para desarrollar correctamente su programa angiogénico no es capaz de inducir migración ni formación de tubos en ausencia de NO. De esta forma, para que MT1-MMP pueda desarrollar su función correctamente durante la migración y la formación de tubos se requiere la presencia de eNOS y la producción de NO por las ECs.



**Figura 18. El NO es necesario para que la función de MT1-MMP se desarrolle correctamente durante la migración y la formación de tubos.**

Se estudió la migración a través de cámaras Transwell de MLEC prodecentes de ratones deficientes o no en eNOS durante 16 horas, en presencia o no del anticuerpo anti-MT1-MMP o el anticuerpo control anti-CD31. Se incluyeron los tratamientos con CCL2 y CXCL12 como controles de migración dependiente e independiente de MT1-MMP, respectivamente. Los datos representan la media y la s.d. de la FI respecto a las células *WT* sin tratar (*Neg*) de tres experimentos independientes. El valor absoluto correspondiente a FI=1 era de 18 células migradas/campo. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.02$  (versus *Neg*); +,  $p < 0.02$  (versus *No Ab*); #,  $p < 0.01$  (versus eNOS +/+) (**panel izquierdo**). En el **panel derecho** se realizaron experimentos similares para estudiar la formación de tubos sobre Matrigel durante 6 horas. Los datos representan la FI respecto a la formación de tubos de las células *WT* sin tratamiento (*Neg*). Se representan las medias y s.d. de  $n$  experimentos independientes ( $n=5$  para eNOS +/+ y  $n=4$  para eNOS -/-). El valor absoluto correspondiente a FI=1 era de 48.21 tubos/campo. \*,  $p < 0.04$  (versus *Neg*); +  $p < 0.01$  (versus *No Ab*);  $p < 0.04$  (versus eNOS +/+). El tratamiento con CCL2 aumentó significativamente la migración y formación de tubos en MLEC eNOS +/+ pero no en MLEC eNOS -/- mientras que CXCL12 indujo la migración y la formación de tubos en ambos casos. Las MLEC eNOS -/- eran menos eficientes en la migración y formación de tubos que las MLEC eNOS +/+.

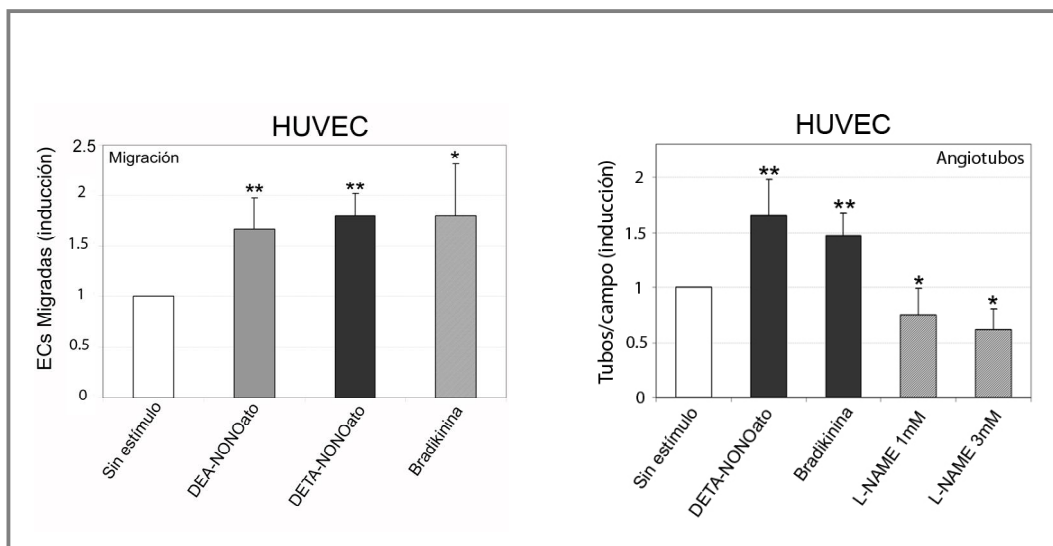
### **3. Relación funcional entre el NO y MT1-MMP durante la angiogénesis**

El NO ha sido ampliamente descrito como un modulador crítico de la angiogénesis; sin embargo, los mecanismos moleculares por los que está regulando este proceso o sus posibles efectores sólo se han caracterizado parcialmente (Morbidei *et al.*, 2003). En este sentido, se ha descrito recientemente la relación de la producción de NO con la activación de distintas MMPs en distintos tipos celulares (Lopez-Rivera *et al.*, 2005) (Dumont *et al.*, 2007) (Bove *et al.*, 2007).

#### **3.1 Implicación de MT1-MMP en la migración y formación de angiotubos inducidas por el NO en ECs**

Una vez demostrado que el NO regula la función de MT1-MMP en ECs en migración, nos planteamos si MT1-MMP sería necesaria para la migración y formación de tubos inducidos por el NO. En este sentido se realizaron experimentos funcionales tanto en ECs humanas como en MLEC de genotipo silvestre o deficientes en MT1-MMP.

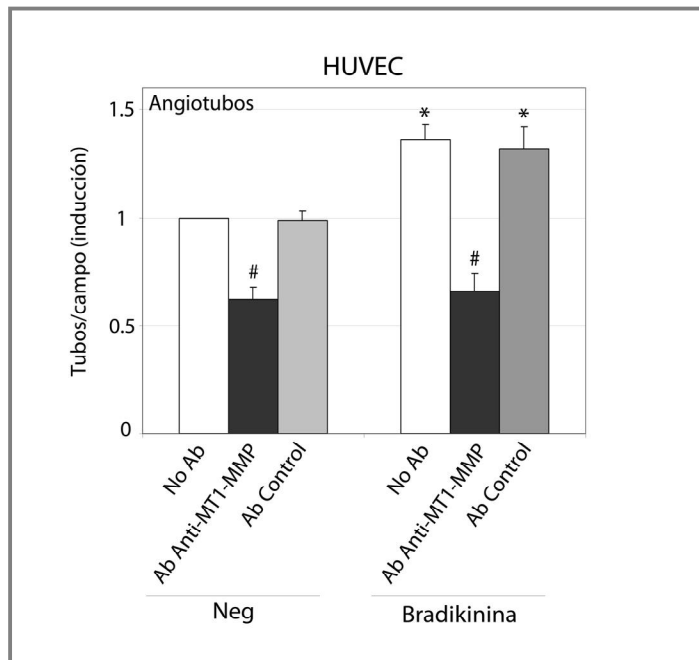
En primer lugar se comprobó el efecto del NO en la migración de ECs humanas. Para ello se trataron HUVEC con distintos donadores de NO (DEA-NONOato y DETA-NONOato) o con bradikinina, y se estudió la migración inducida por el NO. En el panel izquierdo de la Figura 19 se muestra cómo el NO endógeno producido en respuesta a la bradikinina y el NO exógeno liberado por los donadores aumentan significativamente la migración de las ECs. Se realizaron también ensayos de formación de tubos sobre Matrigel en los que a la vez se comprobó el efecto del bloqueo de la síntesis de NO. Como se muestra en el panel derecho de la Figura 19, el NO aumenta la formación de tubos y el tratamiento con L-NAME disminuye la formación de tubos, corroborando así los datos obtenidos previamente por otros autores (Zhao *et al.*, 2002), (Rikitake *et al.*, 2002).



**Figura 19. El NO induce la migración y formación de tubos sobre Matrigel.**

En el **panel izquierdo** se estudió la migración en Transwell de  $40 \times 10^3$  HUVEC tratadas o no con  $100 \mu\text{M}$  de DEA-NONOato o  $100 \mu\text{M}$  de DETA-NONOato o  $1 \mu\text{M}$  de bradikinina. Tras incubar durante 6 horas, las células migradas se fijaron, tiñeron y se contaron. Los datos representan las medias y s.d. de la inducción en la migración sobre las ECs sin estímulo de 4 experimentos independientes. El valor absoluto correspondiente a  $FI = 1$  era de 84 ECs migradas/campo. \*,  $p < 0.005$ ; \*\*,  $p < 0.002$  (versus *Sin estímulo*). En el **panel derecho** se analizó el efecto del NO en la formación de tubos sobre Matrigel en ECs tratadas con DETA-NONOato  $100 \mu\text{M}$ , bradikinina  $1 \mu\text{M}$  o L-NAME. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  (versus *Sin estímulo*). Los datos representan las medias y s.d. de la inducción en la migración sobre las ECs sin estímulo de 3 experimentos independientes. El valor absoluto correspondiente a  $FI = 1$  era de 59.5 tubos/campo.

Para analizar la posible implicación de MT1-MMP en la angiogénesis inducida por el NO, se realizaron experimentos de formación de tubos con ECs humanas tratadas con bradikinina en presencia o no del anticuerpo bloqueante anti-MT1-MMP. En estos experimentos se constató que el tratamiento con el anticuerpo anti-MT1-MMP inhibe la formación de tubos inducida por la bradikinina. Sin embargo, esta formación de tubos inducida por el NO no se ve afectada por el anticuerpo control (Figura 20).



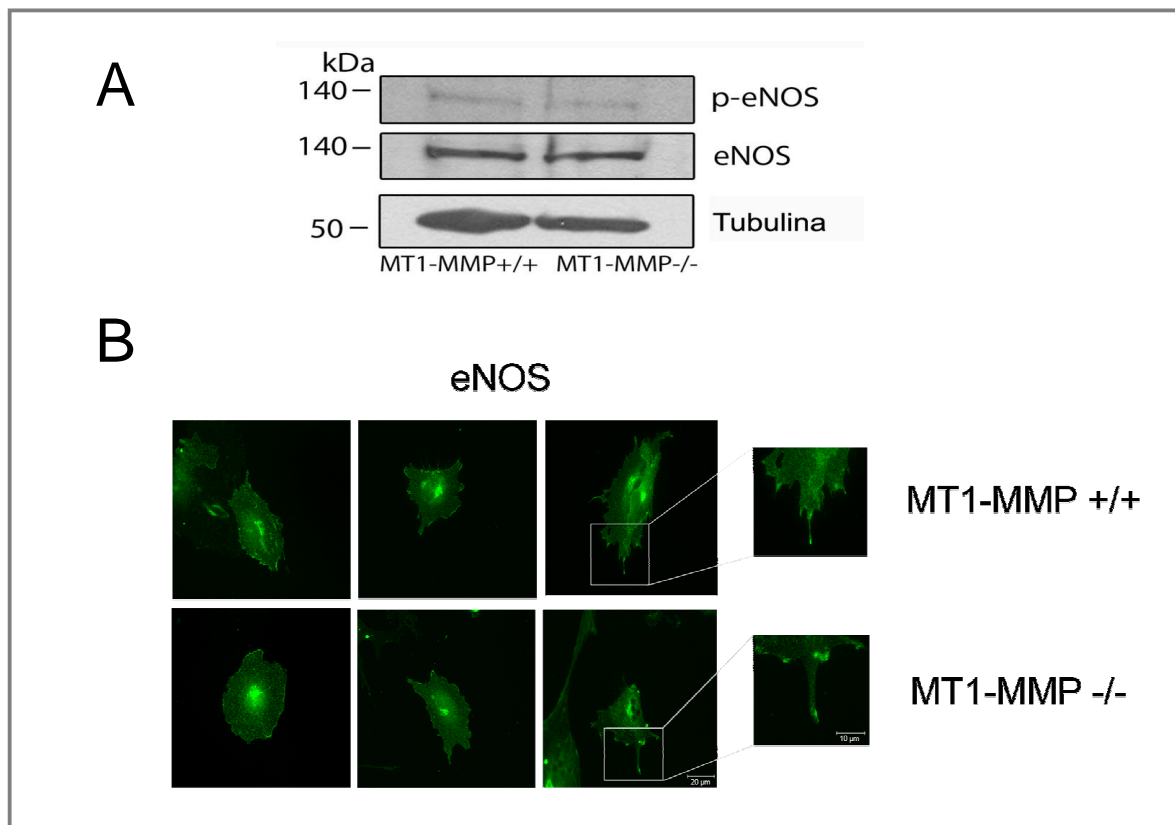
**Figura 20. La actividad de MT1-MMP es necesaria para la formación de tubos inducida por el NO en ECs humanas.** Se estudió la formación de tubos sobre Matrigel durante 6 horas estimulando las ECs con 1 $\mu$ M de bradikina en presencia o no del anticuerpo anti-MT1-MMP o un anticuerpo control. El tratamiento con bradikina aumentó significativamente la formación de tubos. \*,  $p < 0.01$  (*versus Neg*). Sin embargo, la presencia del anticuerpo anti-MT1-MMP inhibe esta inducción de la formación de tubos inducida por bradikina. #,  $p \leq 0.01$  (*versus No Ab*). Los datos representan la FI respecto a la formación de tubos de las células sin tratamiento (*Neg*). Se representan las medias y s.d. de 3 experimentos independientes. El valor absoluto correspondiente a FI=1 era de 59.5 tubos/campo.

Como abordaje experimental complementario al empleo de Ab anti-MT1-MMP, realizamos experimentos similares de migración endotelial y formación de tubos con MLEC prodecentes de ratones *WT* o deficientes en MT1-MMP.

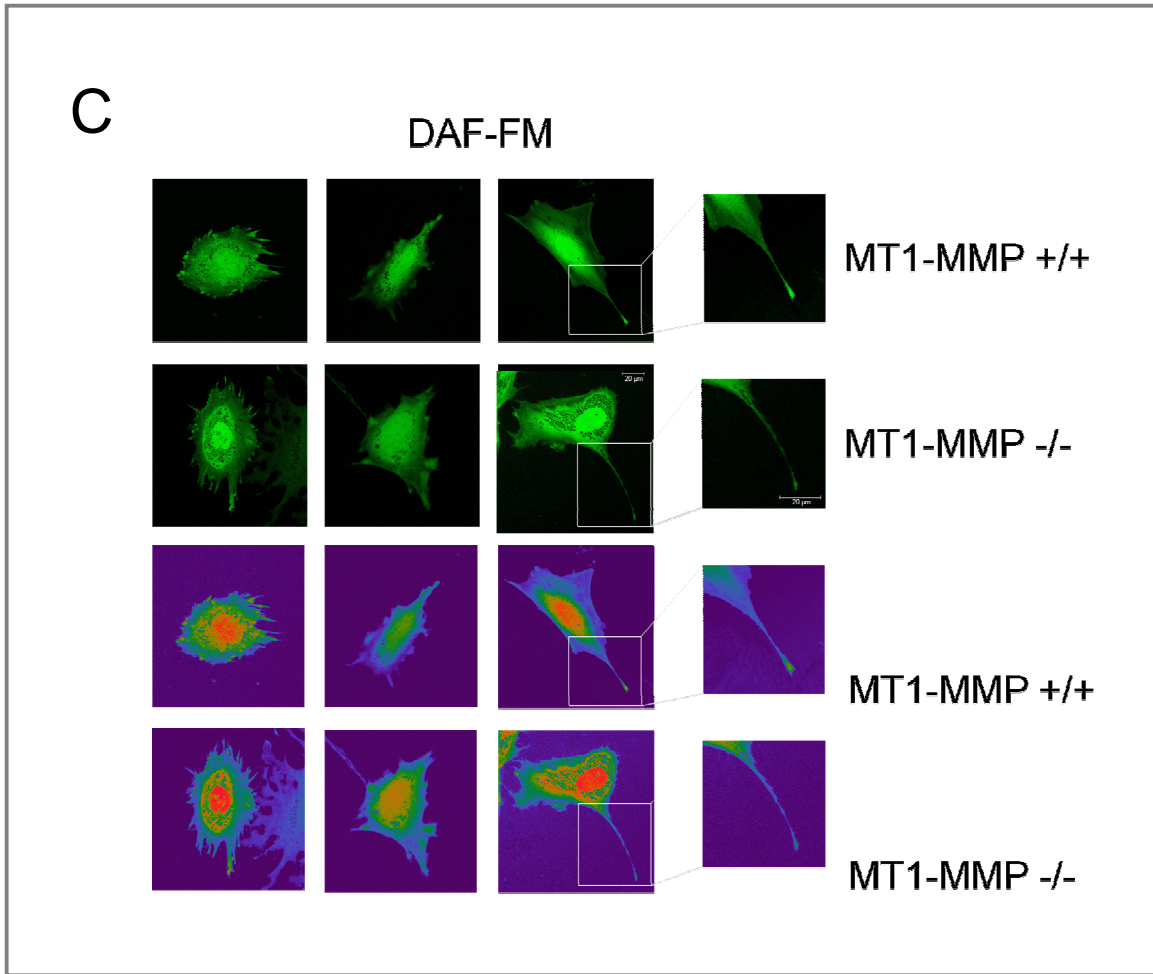
Como primera medida, analizamos la expresión de eNOS en las ECs deficientes en MT1-MMP o de genotipo silvestre. En la Figura 21 A se puede observar que la expresión basal de eNOS es similar en los lisados de las MLEC de genotipo silvestre y en las deficientes en



MT1-MMP. Además comprobamos que eNOS es capaz de localizarse adecuadamente en la membrana independientemente de la expresión de MT1-MMP (Figura 21 B). A su vez analizamos la actividad de eNOS mediante análisis de su forma fosforilada en los lisados totales de estas ECs (Figura 21 A) y mediante visualización de la producción de NO por tinción con la sonda DAF-FM (Figura 21 C). Comprobamos que tanto las MLEC *WT* como las deficientes en MT1-MMP presentan niveles semejantes de fosfo-eNOS y que ambas son capaces de producir NO de forma similar, localizándose este NO en estructuras de membrana (al igual que ocurría en ECs humanas en migración). En la Figura 21 C se muestra la producción de NO en estas células (panel superior) y la distribución de esta producción representada en pseudocolor (panel inferior). En conjunto estos datos indican que en ausencia de MT1-MMP, eNOS se expresa, localiza y activa correctamente.



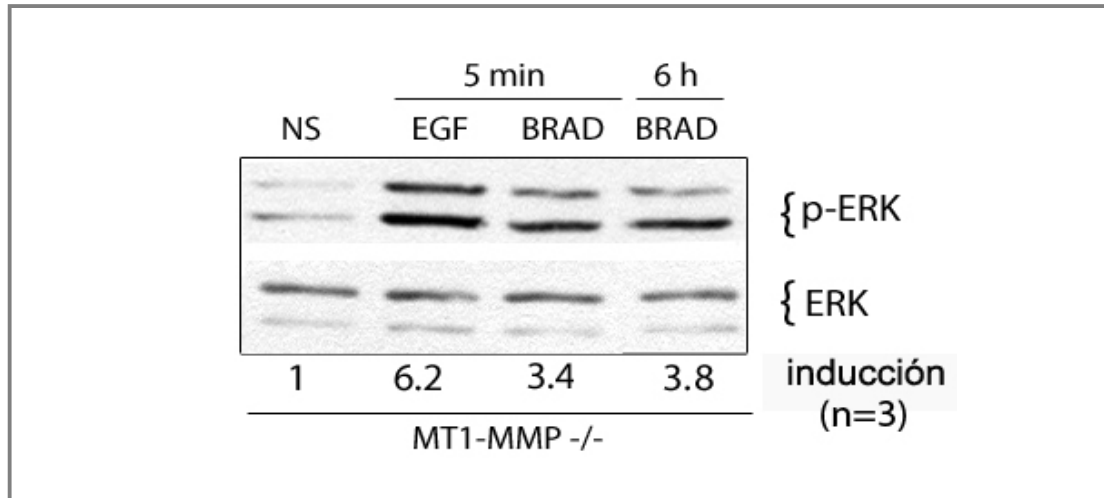
**Figura 21A y B. eNOS se expresa, localiza y activa de forma correcta en ausencia de MT1-MMP.** A) Se analizó por *western blot* la expresión de eNOS (total o fosforilada) en MLEC *WT* (MT1-MMP <sup>+/+</sup>) o deficientes en MT1-MMP (MT1-MMP <sup>-/-</sup>). Se muestra un experimento representativo de 3 realizados. B) La localización de eNOS se visualizó por inmunofluorescencia en estas mismas células.



**Figura 21C. eNOS se expresa, localiza y activa de forma correcta en ausencia de MT1-MMP.** La producción de NO se visualizó por tinción con la sonda específica DAF-FM (**panel superior**). La distribución de NO se representa en pseudolor (**panel inferior**).

De forma adicional se comprobó si la señalización inducida por bradikinina se producía correctamente en ausencia de MT1-MMP. Para ello se realizaron ensayos de *western blot* para visualizar la activación de ERK en respuesta a la señalización por bradikinina. En este sentido, se trataron MLEC deficientes en MT1-MMP con bradikinina a distintos tiempos incluyendo EGF como control de activación y se visualizó ERK fosforilada como indicador de su

activación. En la Figura 22 se puede apreciar que los tratamientos con bradikina y con EGF producen un aumento en la fosforilación de ERK en MLEC.

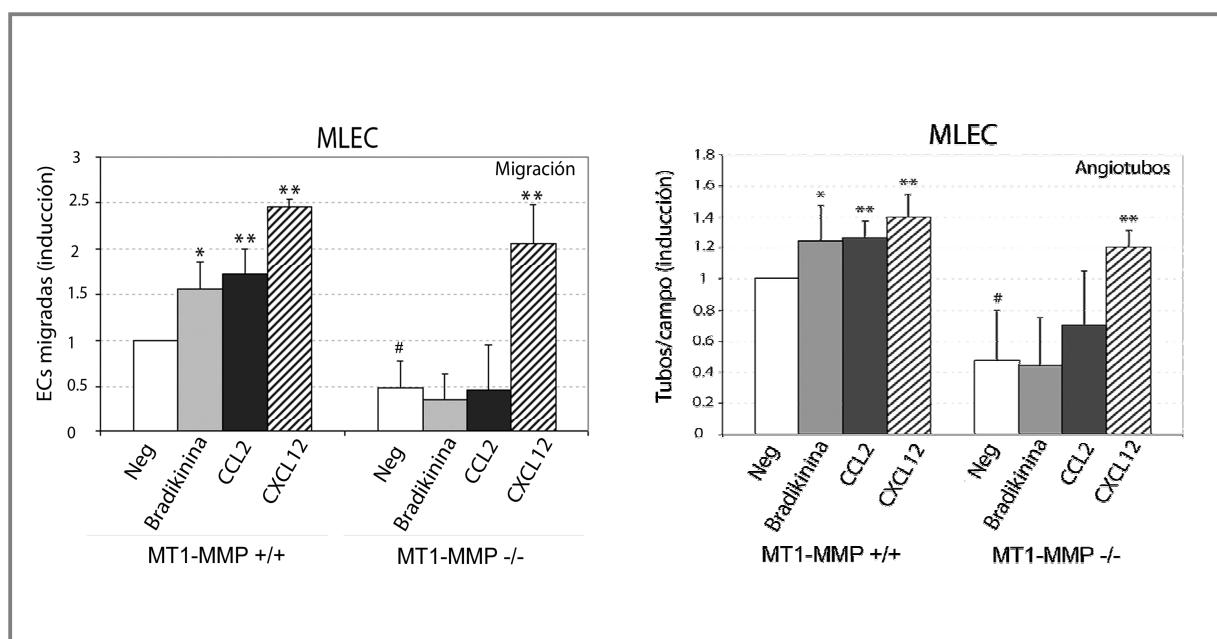


**Figura 22. La bradikina activa la ruta de ERK correctamente en ausencia de MT1-MMP.** MLEC procedentes de ratones deficientes en MT1-MMP se estimularon con bradikina 1 $\mu$ M durante 5 minutos o 6 horas y con EGF (10ng/ml) durante 5 minutos como control de activación. Posteriormente las células se lisaron en tampón RIPA y las proteínas se resolvieron en geles de SDS-PAGE para analizar la fosforilación de ERK por *western blot*.

Una vez comprobado que no existe ningún defecto en la señalización por bradikina ni en la producción de NO por las MLEC deficientes en MT1-MMP, estudiamos el efecto que podría tener el NO endógeno en la migración y formación de tubos capilares en presencia o no de MT1-MMP. Para ello se realizaron ensayos de migración en Transwell y de formación de tubos sobre Matrigel en MLEC *WT* o deficientes en MT1-MMP tratadas durante 6 horas con el activador de eNOS bradikina, lo que daría cuenta del efecto del NO endógeno en estos procesos. Las MLEC deficientes en MT1-MMP migraron menos (Figura 23, panel izquierdo) y formaron menos tubos (Figura 23, panel derecho) que las *WT*, como se ha descrito previamente (Galvez *et al.*, 2005), (Oblander *et al.*, 2005) demostrando así la importancia de MT1-MMP en múltiples procesos durante la angiogénesis. El tratamiento con bradikina aumentó tanto la

migración como la formación de tubos en las MLEC procedentes de ratones *WT* y sin embargo no produjo ningún efecto en las MLEC deficientes en MT1-MMP (Figura 23, paneles derecho e izquierdo, respectivamente). Estos resultados sugieren que la presencia de MT1-MMP es necesaria para una correcta migración celular y formación de angiotubos inducidas por el NO, fenómenos imprescindibles durante la angiogénesis, ya que en ausencia de MT1-MMP estas células son incapaces de migrar o formar tubos en respuesta al NO. Estos datos estarían de acuerdo con el requerimiento de MT1-MMP para la angiogénesis inducida por VEGF, EGF, FGF y PDGF, que a su vez son conocidos moduladores de la producción de NO (Figura 7).

En estos experimentos se incluyeron las quimioquinas CCL2 y CXCL12 como controles de dependencia e independencia de MT1-MMP, y como se muestra en la Figura 23 el tratamiento con CCL2 sólo indujo la migración y formación de tubos en las MLEC *WT*; sin embargo el tratamiento con CXCL12 fue capaz de inducir ambos fenómenos tanto en presencia como en ausencia de MT1-MMP como ya se ha demostrado previamente (Galvez *et al.*, 2005).



**Figura 23. La migración celular y la formación de tubos capilares inducidas por NO requieren la presencia de MT1-MMP.** En el **panel izquierdo** se estudió la migración a través de cámaras Transwell de MLEC procedentes de ratones deficientes o no en MT1-MMP tratadas con 1  $\mu$ M de bradikina durante 16 horas. Se incluyeron tratamientos con 10nM de CCL2 y CXCL12 como controles de migración dependiente e independiente de MT1-MMP, respectivamente. En las gráficas se representan las medias y las desviaciones estándares (s.d.) de la inducción (FI) en la migración de datos procedentes de 4 experimentos independientes. El valor absoluto correspondiente a la FI=1 fue de 15.25 células migradas/campo. \*,  $p < 0.03$ ; \*\*,  $p < 0.02$  (versus *Sin estímulo*); #,  $p < 0.02$  (versus MT1-MMP +/+ *Sin estímulo*). En el **panel derecho** se analizó la formación de tubos inducida por 1  $\mu$ M de bradikina, 10nM de CCL2 o CXCL12. Las células, tratadas o no, se plaquearon sobre Matrigel y los tubos se contaron a las 6 horas. Se representa la FI de la formación de tubos respecto a las células WT para MT-MMP no tratadas (*Sin estímulo*) de n experimentos independientes, siendo n=5 para *Sin estímulo* y bradikina, n=4 para CCL2, and n=3 para CXCL12. El valor absoluto correspondiente a FI = 1 fue de 50.7 tubos/campo. \*,  $p < 0.03$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; (versus *Sin estímulo*); #,  $p < 0.01$  (versus MT1-MMP +/+ *Sin estímulo*).

En conjunto todos estos resultados indican que la señalización por bradikinina así como la expresión, activación y actividad de eNOS, y por tanto la producción de NO se desarrollan de forma correcta e independiente de la presencia MT1-MMP en estas ECs. Por el contrario, MT1-MMP es imprescindible para una correcta migración y formación de tubos inducidas por el NO en estas células, lo que sugiere que la activación y/o función de MT1-MMP sería posterior a la activación de eNOS, y la consiguiente producción de NO.

## DISCUSIÓN

El NO es un regulador importante de la homeostasis vascular y modula múltiples funciones vasculares. Entre ellas, la relajación de las SMCs, la inhibición de la agregación plaquetaria, el reclutamiento de progenitores endoteliales, la disminución de la inflamación y la angiogénesis. En este sentido, la disfunción endotelial se caracteriza por la alteración en la producción del NO endotelial y está implicada en el desarrollo de diversas enfermedades cardiovasculares (Forstermann and Munzel, 2006). Las ECs se encuentran normalmente en un estado de quiescencia formando una monocapa en contacto con la membrana basal. En determinadas condiciones fisiopatológicas, se inicia una respuesta angiogénica mediante la cual se produce la formación de nuevos vasos a partir de vasos preexistentes (Carmeliet, 2003). El NO producido por las ECs desempeña un papel primordial en múltiples pasos de la angiogénesis, en concreto durante la migración endotelial y la formación de angiotubos (Morbideilli *et al.*, 1996), (Murohara *et al.*, 1998b), (Noiri *et al.*, 1998). En este sentido, se ha descrito que distintas proteínas importantes para el desarrollo de la angiogénesis como la integrina  $\alpha_v\beta_3$  y la metaloproteasa MMP13 están implicadas en la migración y formación de angiotubos inducidos por el NO (Murohara *et al.*, 1999), (Lopez-Rivera *et al.*, 2005).

Durante el proceso angiogénico, las ECs se activan y pasan de un estado de quiescencia a un estado de migración polarizada, pierden la adhesión intercelular y a la matriz y degradan la membrana basal subyacente. Para remodelar la membrana basal, las ECs emplean sus enzimas proteolíticas; las MMPs destacan como las principales proteasas implicadas en este proceso, y entre ellas, MT1-MMP desempeña un papel imprescindible durante distintos pasos de la angiogénesis como la degradación de distintas matrices, la migración e invasión celular, y la formación de tubos (Chun *et al.*, 2004), (Sabeh *et al.*, 2004), (Galvez *et al.*, 2001). Posteriormente, las ECs migran hasta el lugar donde han de formarse los nuevos vasos y proliferan. Finalmente, se forman los nuevos vasos a partir de estas ECs y se deposita la nueva ECM.

En primer lugar, demostramos que la función de MT1-MMP es necesaria para la formación de angiotubos en respuesta a múltiples estímulos angiogénicos (factores de crecimiento, citoquinas y mediadores inflamatorios y quimioquinas). La importancia de la función de MT1-MMP se demostró mediante el bloqueo de la proteasa con anticuerpos en ECs humanas y los resultados se corroboraron con ECs murinas deficientes en MT1-MMP. Nuestros resultados confirman la importancia de MT1-MMP durante la respuesta angiogénica descrita

previamente (Galvez *et al.*, 2001), (Galvez *et al.*, 2002), (Galvez *et al.*, 2005), (Oblander *et al.*, 2005), (Chun *et al.*, 2004) y demuestran su implicación en la respuesta angiogénica inducida por diversos factores. Los datos también indican que la función de MT1-MMP no es un requisito universal, ya que determinados factores inflamatorios como LPS o CXCL12 son capaces de inducir angiogénesis sin la función de MT1-MMP. En respuesta a quimioquinas como CXCL12, otras proteasas como MT2-MMP u otras rutas como la de la proteína hemo oxigenasa 1 pueden desempeñar papeles importantes en el remodelamiento de la matriz (Zhang *et al.*, 2005), (Deshane *et al.*, 2007).

Los factores angiogénicos empleados que requieren la función de MT1-MMP activan múltiples vías de señalización y mediadores solubles. De hecho, varios de ellos son conocidos moduladores de eNOS y de la producción de NO en el endotelio (Kondo *et al.*, 2004), (Murphy *et al.*, 2001).

Teniendo en cuenta que tanto el NO como MT1-MMP son importantes mediadores de la respuesta angiogénica, nos propusimos investigar su posible relación funcional en este proceso.

MT1-MMP desempeña un papel primordial en el desarrollo de distintos pasos de la angiogénesis, como son la degradación de la ECM, la migración y la invasión celular, por ello su localización subcelular y actividad han de estar finamente reguladas para garantizar que la actividad proteasa ocurra en los momentos y lugares de la célula y del espacio extracelular apropiados.

La regulación de la localización subcelular y actividad de MT1-MMP ocurre, entre otros mecanismos, en función de la matriz extracelular y del estado de quiescencia o migración de la EC (Galvez *et al.*, 2001), (Galvez *et al.*, 2002). En este sentido, en estado de confluencia celular sobre determinadas matrices MT1-MMP se localiza en los contactos celulares, mientras que durante la migración celular se moviliza a protrusiones celulares, formando un complejo con caveolina-1 e integrina  $\alpha_v\beta_3$  (Galvez *et al.*, 2004). En nuestro estudio encontramos una regulación similar de la localización subcelular de eNOS, de forma que en confluencia está presente en dichos contactos celulares en función de la ECM y durante la migración es reclutada a protrusiones de membrana, implicadas en la migración celular. La localización de eNOS constitutivamente activa en los contactos célula-célula se ha descrito previamente, y junto con VE-cadherina mantiene la integridad de las uniones intercelulares (Predescu *et al.*, 2005), (Govers *et al.*, 2002). Por otro lado, recientemente se ha descrito un mecanismo de regulación de la localización subcelular de eNOS, según el cual en ECs confluentes NOSTRIN, la proteína inductora del tráfico de eNOS, se encuentra en contactos celulares, formando un complejo con eNOS y caveolina-1 mientras que en subconfluencia NOSTRIN está dispersa por



el citosol (Schilling *et al.*, 2006). Así, NOSTRIN podría estar regulando la localización de eNOS en función del estado de confluencia o migración.

Por otro lado, demostramos que durante la migración celular eNOS y MT1-MMP están presentes en protrusiones de membrana, *filopodia* y *lamellipodia*, y colocalizan en estas estructuras de membrana asociadas a motilidad celular. Esta localización se ha descrito en otros tipos celulares; en este sentido, MT1-MMP se encuentra en *invadopodia* y en frentes de avance de osteoclastos, fibroblastos transformados, células de melanoma ó glioblastoma y ECs, y su dominio citosólico parece estar implicado en dicha localización (Sato *et al.*, 1997), (Nakahara *et al.*, 1997), (Lehti *et al.*, 2000), (Galvez *et al.*, 2001). Asimismo, eNOS se localiza principalmente en dichas estructuras durante la migración de HUVEC, HeLa y células de aorta de rata (Bulotta *et al.*, 2006), (Poppa *et al.*, 1998). Además, demostramos que ambas proteínas se encuentran activas en estas protrusiones de membrana asociadas a motilidad celular y que esta activación ocurre en respuesta a la migración, confirmando la importancia de sus funciones en estas estructuras durante esta fase de la angiogénesis (Galvez *et al.*, 2001). El hecho de que la migración celular module la actividad de eNOS y de MT1-MMP, hace que la regulación de la localización de ambas proteínas descrita en nuestro estudio cobre una importancia vital en la regulación de sus funciones. En este sentido, es importante destacar que el NO es una molécula de señalización extremadamente reactiva y de vida media muy corta, de esta forma, su distribución subcelular depende en gran medida de la localización subcelular de eNOS y de su producción local (Fulton *et al.*, 2004). En este estudio demostramos que la producción de NO durante la migración endotelial ocurre en estas protrusiones de membrana y encontramos que esta producción de NO ocurre de forma rápida y dinámica. La sonda de NO, DAF-FM, nos permitió visualizar focos de producción de NO en zonas discretas de la membrana celular que aparecían y desaparecían en segundos o minutos. Este patrón podría asemejarse a la producción de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  que ocurre también en respuesta a la migración inducida por múltiples factores angiogénicos (Isshiki *et al.*, 1998). La inducción de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  por distintos agonistas se produce en el frente de avance de las ECs durante la migración, zonas que también se enriquecen en caveolas, de forma que la movilización o internalización de eNOS a través del tráfico caveolar permitirían su acercamiento a estas zonas; la proximidad de eNOS a los gradientes de  $\text{Ca}^{2+}$  podría suponer un mecanismo de regulación de su actividad.

eNOS y MT1-MMP también pueden sufrir distintas modificaciones como la palmitoilación. Esta modificación podría suponer otro mecanismo posiblemente implicado en la regulación de la localización de estas proteínas en los distintos compartimentos de la membrana. En este sentido, se ha descrito que la palmitoilación de eNOS por la DHHC-21

palmitoil transferasa es necesaria para su correcta localización y producción de NO en ECs (Fernandez-Hernando *et al.*, 2006). Por otro lado, la palmitoilación de MT1-MMP es también importante para su internalización y para la inducción de la migración celular (Anilkumar *et al.*, 2005). Un tercer mecanismo de regulación de la localización de MT1-MMP y eNOS durante la migración podría estar mediado por la internalización de estas proteínas. La internalización de MT1-MMP por mecanismos dependientes de caveolina-1 es importante en la regulación de su actividad en ECs (Galvez *et al.*, 2004). Además, tras activación por diferentes factores de crecimiento o por bradikinina, se produce la rápida internalización de eNOS, de forma sincrónica a la internalización de caveolina-1, por mecanismos que requieren de la función de dinamina-2. Esta internalización de eNOS también está mediada por otras proteínas como N-WASP, que promueve la polimerización de actina o la proteína NOSTRIN, que regula la translocación de eNOS desde la membrana plasmática hasta vesículas intracelulares de forma dependiente del tráfico caveolar (Zimmermann *et al.*, 2002), (Icking *et al.*, 2005), (Schilling *et al.*, 2006). Esta internalización podría suponer también un mecanismo de relocalización de eNOS a distintos compartimentos subcelulares, regulando así su actividad. En relación con esto, se ha descrito que la proteína gp60 induce la internalización y activa la proteína Src que a su vez fosforila a la caveolina-1 y Akt, de forma que eNOS es fosforilada y activada a su vez (Maniatis *et al.*, 2006). Por otro lado, la estimulación con VEGF induce la fosforilación de caveolina-1 por Src y la consiguiente asociación de MT1-MMP a fosfo-caveolina-1 (Labrecque *et al.*, 2004).

Otros mecanismos que podrían estar involucrados en la regulación de la localización y actividad de eNOS y MT1-MMP serían la activación de distintas rutas de señalización como PI3K/Akt o GTPasas implicadas en la reorganización del citoesqueleto. PI3K/Akt están implicadas en la migración direccional y la angiogénesis y se ha descrito que Akt es capaz de activar a eNOS en el frente de avance celular fosforilándola en su serina 1177 (Dimmeler *et al.*, 1999a), (Ackah *et al.*, 2005). Además, la actividad de MT1-MMP inducida por ciertas citoquinas depende de la activación de PI3K/Akt y Rac (Galvez *et al.*, 2005). Las GTPasas Rac, Rho y Cdc42 están implicadas en la reorganización del citoesqueleto necesaria para que se formen estructuras de membrana asociadas a la motilidad celular: Rho induce la formación de fibras de estrés citoplásmicas y la contracción de actina-miosina; Rac induce la extensión de la membrana para formar los *lamellipodia* y Cdc42 regula la formación de protrusiones de membrana como los *filopodia* (Price *et al.*, 1998). Estas GTPasas podrían estar modulando así el reclutamiento de MT1-MMP y eNOS a dichas estructuras o bien su asociación al

citoesqueleto a través de otras proteínas como CD44 o PECAM, respectivamente (Mori *et al.*, 2002), (Dusserre *et al.*, 2004).

La migración de las ECs induce la expresión y actividad de MT1-MMP (Galvez *et al.*, 2001), así como la localización y activación de eNOS en protrusiones de membrana. Por ello, analizamos si el NO producido en respuesta a la migración podría estar modulando la actividad de MT1-MMP en dichas protrusiones de membrana. En este sentido, demostramos que el NO es capaz de modular la expresión, actividad y localización de MT1-MMP en ECs.

Por un lado, demostramos que la presencia del NO es necesaria para la correcta localización de MT1-MMP en la superficie celular durante la migración. Esto se demuestra mediante el bloqueo de la síntesis de NO con inhibidores de la actividad de eNOS y con células deficientes en eNOS, incapaces de producir NO. Además, encontramos que el NO regula la expresión de MT1-MMP en la membrana celular mediante dos mecanismos diferentes. Por un lado, a tiempos largos (16 horas) aumenta la expresión en la superficie celular sin afectar a la expresión y actividad global de MT1-MMP. Por otro lado, a tiempos más cortos (de 1 a 6 horas), el NO modula la localización y actividad de MT1-MMP en la membrana celular.

En relación con la regulación de MT1-MMP descrita a tiempos largos, se ha descrito que el NO regula de forma similar a la integrina  $\alpha_v\beta_3$ , manteniendo o aumentando su expresión en la superficie celular sin afectar a la cantidad de proteína total. Por un lado, la ausencia de NO disminuye la expresión de dicha integrina en la superficie celular y la presencia de NO aumenta la expresión de dicha integrina (Murohara *et al.*, 1999), (Lee *et al.*, 2000). Esta integrina desempeña un papel importante en la adhesión de la EC a la ECM facilitando la migración celular. De hecho, es necesaria para que el NO induzca la formación de tubos capilares sobre Matrigel. Durante la migración endotelial MT1-MMP se moviliza junto a integrinas  $\alpha_v\beta_3$  a estructuras asociadas a motilidad celular, formándose el complejo MT1-MMP/  $\alpha_v\beta_3$ /caveolina-1; de esta manera, la formación de este complejo y la movilización de MT1-MMP regulan la actividad de la proteasa en dichas estructuras (Galvez *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta esto y que la regulación y/o función de esta integrina se encuentran vinculadas a su presencia en caveolas, la activación y/o expresión en membrana de estas proteínas inducidas por el NO podría estar regulando de alguna manera su asociación a MT1-MMP y así su movilización y actividad en protrusiones de membrana.

Como hemos comentado, a tiempos cortos (de 1 a 6 horas) el NO regula tanto la localización de MT1-MMP como su actividad colagenolítica. La regulación de MT1-MMP a tiempos cortos correlaciona con la rápida producción de NO encontrada en respuesta a la migración; en este sentido analizamos los posibles mecanismos de modulación de MT1-MMP

por el NO a estos tiempos. Estos experimentos demostraron que el NO producido en respuesta a la migración regula la localización y actividad de MT1-MMP en zonas discretas de la membrana celular, por un mecanismo que implica la inducción de la acumulación o *clustering* de MT1-MMP en zonas asociadas a motilidad celular. Además, este aumento de *clusters* de MT1-MMP en respuesta al NO ocurre de forma paralela a los tiempos de liberación del NO por los donadores de NO, DEA-NONOato y DETA-NONOato utilizados, siendo más rápido el tratamiento con DEA-NONOato (de 1 a 3 horas) y más lento con DETA-NONOato (de 3 a 6 horas). A estos mismos tiempos es cuando encontramos inducción de la actividad colagenolítica de MT1-MMP en respuesta al NO exógeno, liberado por donadores de NO y al NO producido por las ECs tratadas con bradikina. Corroborando nuestra hipótesis previa, esta actividad de MT1-MMP ocurre de forma localizada en zonas discretas de la membrana celular, en concreto en protrusiones de membrana, dificultando la detección de cambios en la actividad global.

Se ha descrito que el VEGF es capaz de regular la activación de eNOS por distintos mecanismos: como respuesta aguda a la activación por VEGF, se produce el aumento en la producción de NO a tiempos cortos, con un pico máximo a 1 hora y bajada al nivel basal a las 12 horas, mecanismo regulado en parte por el aumento rápido de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducido por el VEGF. Como respuesta crónica, el VEGF es capaz de inducir la expresión del mRNA de eNOS a partir de las 6 a 9 horas de estimulación, con el consiguiente aumento en su expresión proteica a las 24 horas, momento en el que aparece otro pico de producción de NO (Hood *et al.*, 1998). Estos distintos mecanismos de la regulación de la actividad de eNOS correlacionan con la diferente regulación de MT1-MMP por el NO que encontramos en nuestro estudio.

Como hemos comentado anteriormente, la regulación de MT1-MMP a tiempos cortos podría deberse al incremento de la actividad de eNOS inducido por mecanismos celulares rápidos como el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular o la movilización de eNOS a compartimentos determinados de la membrana y la regulación descrita a tiempos largos podrían correlacionarse con el incremento en la expresión proteica de eNOS. Estos datos sugieren que durante la migración de las ECs se desencadenan mecanismos limitados a zonas discretas de la célula que modulan de forma local una parte del *pool* total celular de ciertas proteínas como eNOS y MT1-MMP. Es probable que entre estos mecanismos se encuentre la modulación de la recirculación de las proteínas entre el citosol y la membrana, lo cual no sería posible detectar por métodos en los que participa el *pool* total de la proteína, como la citometría de flujo o el fraccionamiento celular. La acumulación o *clustering* anómalo observado en MLEC procedentes de ratones deficientes en eNOS apoyan nuestra hipótesis ya que demuestran que en ausencia de NO, MT1-

MMP no es capaz concentrarse de forma correcta en la membrana celular. En este sentido, el análisis de la localización en zonas discretas de la membrana nos muestra que en las células de genotipo silvestre MT1-MMP aparece en *clusters* o agrupaciones bien definidas mientras que en las células deficientes en eNOS la acumulación de MT1-MMP se visualiza como una tinción punteada. Por otro lado, la degradación de colágeno tipo I, que es llevada a cabo mayoritariamente por MT1-MMP en las ECs está significativamente reducida en ausencia de NO, como demostramos utilizando las MLEC deficientes en eNOS. En conjunto demostramos que el NO está regulando MT1-MMP a dos niveles. Por un lado, aumenta la expresión de MT1-MMP en la superficie celular a tiempos largos y por otro lado regula la compartimentalización y así la actividad de MT1-MMP en zonas discretas de la membrana de forma rápida y dinámica a tiempos cortos. Aunque aún desconocemos los mecanismos por los cuales ocurre este proceso, el hecho de que la expresión y actividad global de MT1-MMP no se vean afectadas por estos mecanismos apunta a que la regulación está ocurriendo a nivel del tráfico vesicular. En este sentido, se sabe que el NO regula el tráfico de vesículas y el transporte de proteínas desde el aparato de Golgi hasta la membrana celular así como el transporte retrógrado desde la membrana a endosomas. Uno de los principales mecanismos por los que el NO regula el tráfico de vesículas es mediante la S-nitrosilación de distintas proteínas implicadas en el tráfico de proteínas. De esta manera, el NO endotelial es capaz de bloquear la exocitosis de vesículas como los cuerpos de Weibel-Palade al nitrosilar una proteína, NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor), implicada en la maquinaria de desensamblaje, previa a la exocitosis, de las vesículas ancladas a membrana; en los ratones *KO* para eNOS NSF no se S-nitrosila (Lowenstein, 2007). Se ha descrito que el NO es capaz de estabilizar un complejo de proteínas SNAREs (soluble NSF attachment receptor proteins), proteínas transmembrana implicadas en la fusión de las vesículas a la membrana celular (Meffert *et al.*, 1996), así como regular proteínas tipo Ras, que podrían estar implicadas en las vías de señalización previas a la exocitosis (Lander *et al.*, 1996). También se ha descrito que el NO induce además la expresión de receptores en la membrana celular; la S-nitrosilación de NSF en neuronas favorece la unión de esta proteína al receptor de glutamato AMPA permitiendo su inserción en la superficie de la membrana (Huang *et al.*, 2005). Estos mecanismos podrían participar en la regulación de la formación y/o estabilización de *clusters* de MT1-MMP observados en la membrana celular en repuesta al aumento de NO.

Por otro lado, el NO no sólo regula el tráfico de vesículas del interior celular hacia la membrana, sino que también está implicado en la internalización de proteínas ancladas en la membrana. La endocitosis es un proceso complejo que dirige proteínas de la membrana celular bien hacia la degradación en lisosomas o bien hacia el reciclaje a distintas zonas de la

membrana (Conner and Schmid, 2003). La endocitosis mediada por receptores implica la interacción de receptores de membrana con ligandos solubles y su agrupación en vesículas recubiertas de clatrina. Una vez que se han formado estas vesículas en la membrana celular, la GTPasa, dinamina recubre el cuello de estas vesículas facilitando su escisión de la membrana y de esta manera su internalización. (Mellman and Warren, 2000), (Huang *et al.*, 2005). Se ha descrito que la interacción de eNOS y dinamina, aumenta la actividad de la sintasa de NO a la vez que localiza la producción de NO en los lugares de endocitosis (Cao *et al.*, 2001). La S-nitrosilación de la dinamina induce la oligomerización y la actividad de esta GTPasa, favoreciendo así la endocitosis (Wang *et al.*, 2006). Uno de los mecanismos principales de la regulación de la localización de MT1-MMP es su internalización. En este sentido, existe un mecanismo de internalización de MT1-MMP mediado por vesículas de clatrina y dinamina en el que la cola citoplásmica de MT1-MMP es importante (Uekita *et al.*, 2001), (Jiang *et al.*, 2001). Éste y otros estudios demuestran que la internalización de MT1-MMP ocurre principalmente en el frente de adhesión celular y que el bloqueo de esta internalización, no afectando a la expresión y actividad netas de MT1-MMP, afecta de forma importante a la capacidad de migración e invasión celular en Matrigel (Uekita *et al.*, 2001), (Lehti *et al.*, 2000). Otros estudios sugieren que la internalización de MT1-MMP estaría regulando la recirculación de MT1-MMP (Remacle *et al.*, 2003). La internalización de MT1-MMP por vesículas de clatrina y/o por caveolas podría estar siendo modulada por el NO, favoreciendo su actividad en las zonas de membrana asociadas a motilidad durante la migración e invasión celular. Nuestros resultados indican que la regulación de MT1-MMP por el NO estaría ocurriendo de forma rápida y localizada en regiones discretas de la membrana asociadas a motilidad celular, de manera que la expresión y la actividad globales de MT1-MMP no se ven afectadas, de forma similar a lo descrito por Uekita *et al.* respecto a la internalización de MT1-MMP en el frente de adhesión celular.

Recientemente se ha descrito un nuevo mecanismo de regulación del tráfico de MT1-MMP. Según este mecanismo, MT1-MMP estaría almacenada en vesículas submembranosas y durante la degradación de la ECM se produciría un reclutamiento de la proteasa a estructuras de membrana implicadas en la invasión de matrices de COL tridimensional; este fenómeno está regulado por la GTPasa de tipo Ras, Rab8, implicada en el transporte polarizado y exocitosis de proteínas a las protrusiones de membrana (Bravo-Cordero *et al.*, 2007). En esta redistribución de MT1-MMP a estructuras de invasión celular, la adhesión dependiente de integrinas  $\beta 1$  presenta un papel crucial. Los mecanismos de regulación de Rab8 se desconocen, pero se ha descrito que aunque esta GTPasa no forma parte de los complejos de proteínas SNAREs, está

implicada en la estabilización y oligomerización de estos complejos (Ren *et al.*, 1996). Por otro lado, se ha descrito que el NO es capaz de regular la actividad de las GTPasas Ras, Rho y Rab, modulando su estado de unión a GTP (estado activo) o GDP (estado inactivo). Estas GTPasas contienen distintos “motivos activos redox” lo cual las hace sensibles a regulación por el NO y especies reactivas de oxígeno (ROS) y de esta manera regulan una amplia variedad de procesos como la proliferación celular, la apoptosis y el tráfico vesicular. Sin embargo, la activación o inactivación de Ras, Rho y Rab depende de las condiciones celulares (Raines *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta que el NO es también capaz de estabilizar el complejo de proteínas SNAREs y que modula proteínas tipo Rab, implicadas en las vías de señalización previas a la exocitosis, es posible que exista un mecanismo de regulación de la exocitosis de MT1-MMP mediada por Rab8 que esté siendo modulado por el NO.

En nuestro estudio no hemos estudiado las rutas de señalización que podrían estar involucradas en la regulación de MT1-MMP por el NO. Se sabe que NO ejerce muchas de sus funciones mediante la activación de la guanilato ciclasa soluble (sGC) o de membrana (pGC) y la producción del segundo mensajero, cGMP. Dependiendo de su localización y regulación el cGMP producido regula diferentes funciones como la proliferación y angiogénesis de las ECs (Pyriochou *et al.*, 2006). Se ha descrito que el cGMP derivado de la producción de NO modula MMPs como MMP9 en músculo liso vascular y en epitelio bronquial (Marcet-Palacios *et al.*, 2003), (Bove *et al.*, 2007), MMP13 en ECs (Zaragoza *et al.*, 2002) o MMP2 y MMP 9 en fibroblastos (Huang *et al.*, 2005). Las vías de señalización que regulan estos mecanismos aún se desconocen, pero probablemente estén implicados receptores acoplados a proteínas G, tirosin kinasas y fosfatasa, entre otras moléculas de señalización. Sin embargo, la regulación de estas MMPs por el cGMP ocurre principalmente a nivel transcripcional, por lo tanto es poco probable que este sea el mecanismo de regulación de MT1-MMP en nuestro caso.

Finalmente, es importante mencionar que otro posible mecanismo de modulación de MT1-MMP mediado por el NO o por especies reactivas de nitrógeno (RNS) derivadas del NO, serían modificaciones no enzimáticas tales como la S-nitrosilación o la nitración. Estas modificaciones podrían ocurrir bien de forma directa sobre MT1-MMP o en otras proteínas que a su vez regulen a MT1-MMP, como se ha comentado para moléculas reguladoras del tráfico proteico. En este sentido, se ha descrito la activación de otras MMPs como MMP9 (por S-nitrosilación) (Gu *et al.*, 2002), (Manabe *et al.*, 2005) o MMP2 (por nitración) (Rajagopalan *et al.*, 1996).

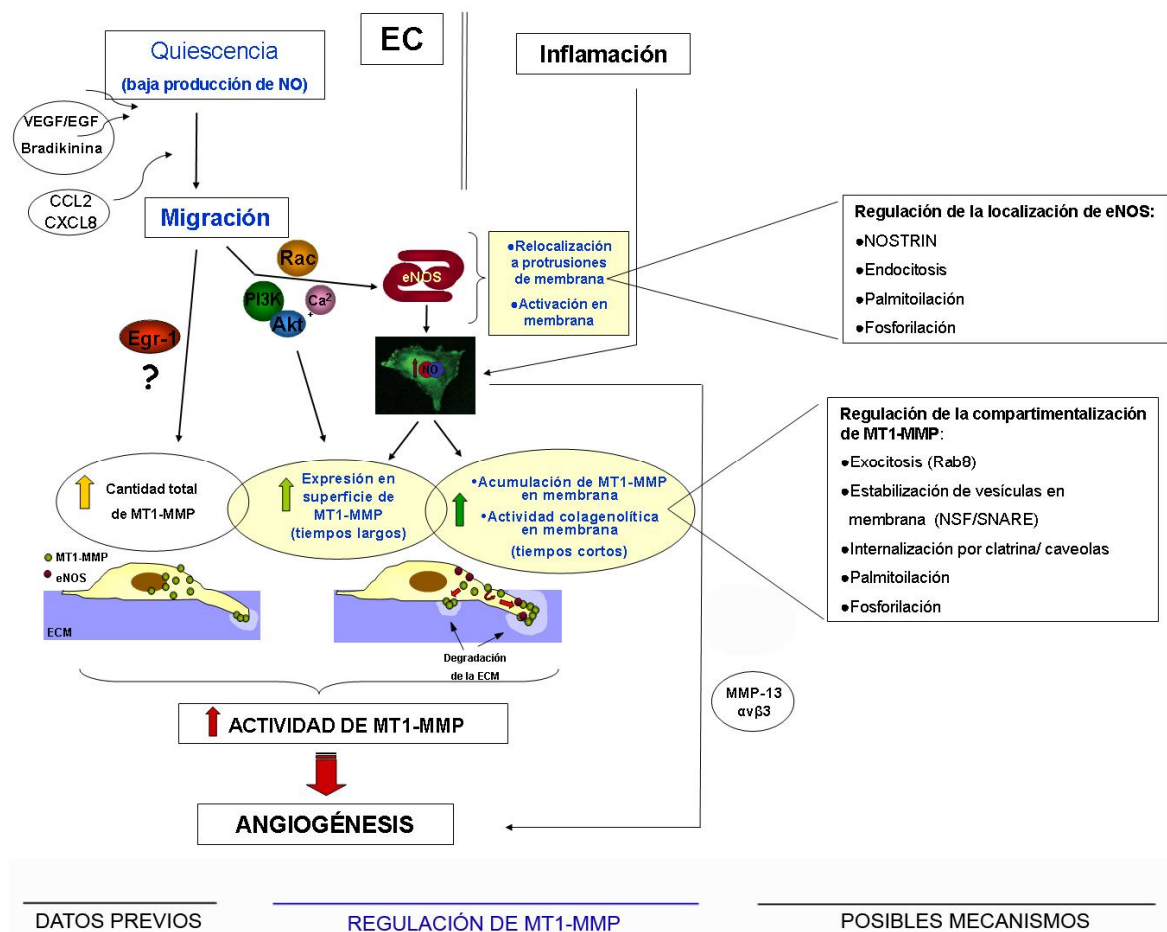
La relevancia funcional de la regulación de MT1-MMP por el NO se estudió en MLEC deficientes en eNOS, incapaces de producir NO. En este sistema comprobamos que la expresión

en la superficie celular, la localización en membrana y la actividad de MT1-MMP se ven alteradas. Teniendo en cuenta que la función de MT1-MMP es de gran importancia para el desarrollo de la respuesta angiogénica, estos datos concuerdan con la angiogénesis y migración deficientes descritas en nuestro estudio y en estudios previos tanto *in vivo* como *in vitro* (Lee *et al.*, 1999), (Murohara *et al.*, 1999), (Lopez-Rivera *et al.*, 2005). Además, los estudios funcionales de migración y formación de angiotubos inducidos por citoquinas cuyo programa de señalización depende de MT1-MMP (CCL2) nos muestran que se necesita la presencia del NO para que se desarrolle correctamente la función de MT1-MMP durante la angiogénesis. De esta manera, demostramos que el NO es un regulador de la homeostasis de MT1-MMP. Por otro lado, es importante destacar que esta regulación de la función de MT1-MMP por el NO ocurre durante la migración celular pero no en células quiescentes; en este sentido, en ECs en confluencia el NO no modula la expresión ni la actividad de MT1-MMP.

La identificación de MT1-MMP como una nueva diana del NO en migración y angiogénesis se confirmó realizando experimentos funcionales con anticuerpos bloqueantes de MT1-MMP y con MLEC deficientes en MT1-MMP. Estos experimentos demuestran que tanto la migración endotelial como la formación de tubos inducidos por el NO requieren la función de MT1-MMP. Por otro lado, la ausencia de MT1-MMP no altera la expresión, localización ni actividad de eNOS, concordando con nuestra hipótesis inicial, según la cual MT1-MMP estaría actuando posteriormente y como consecuencia de la producción de NO. De esta manera, el NO podría ser un efector común de varias vías desencadenadas en respuesta a distintos factores angiogénicos como los factores de crecimiento (VEGF, EGF, FGF y PDGF- $\beta$ ), citoquinas (IL-1) y quimioquinas (CCL2) descritos en nuestro estudio, en los que se requiere la función de MT1-MMP.

En resumen, en este estudio demostramos la existencia de la relación funcional entre MT1-MMP y el NO. Durante la migración endotelial eNOS es localizada y activada en protrusiones de membrana asociadas a la motilidad celular, donde colocaliza con MT1-MMP. Mostramos por primera vez que la producción de NO ocurre de forma rápida y dinámica en dichas estructuras en las ECs. Este NO es capaz de inducir la acumulación de *clusters* de MT1-MMP activa en la membrana celular, con el consiguiente aumento en la degradación de COL I. Por otro lado, a tiempos largos, el NO aumenta la expresión de MT1-MMP en la superficie celular, probablemente mediante mecanismos que implican la movilización subcelular de esta proteasa. Asimismo, demostramos que el NO regula la función de MT1-MMP durante la migración y la formación de angiotubos y finalmente que MT1-MMP esta implicada en la respuesta angiogénica inducida por el NO (Esquema 1).





Esquema 1.

## CONCLUSIONES

1. MT1-MMP está implicada en el desarrollo del programa angiogénico inducido por VEGF, EGF, FGF, PDGF- $\beta$ , IL-1 y CCL2 durante la formación de angiotubos *in vitro* pero no por otros estímulos como el LPS o CXCL12.
2. eNOS está presente en los contactos de ECs en confluencia celular sobre matrices de COL I; durante la migración eNOS es reclutada a protrusiones de membrana asociadas a motilidad celular de forma independiente de la ECM.
3. eNOS y MT1-MMP colocalizan y se activan en protrusiones de membrana de ECs durante la migración celular. La producción de NO ocurre de forma localizada y dinámica en dichas protrusiones de membrana.
4. El NO regula MT1-MMP de forma dual en ECs en migración: a tiempos largos aumenta la expresión MT1-MMP en la superficie sin afectar a la cantidad total de MT1-MMP y a tiempos cortos regula la localización y actividad de MT1-MMP en protrusiones de membrana asociadas a motilidad celular.
5. El NO es necesario para que la función de MT1-MMP se desarrolle correctamente durante la migración endotelial y la formación de angiotubos *in vitro*.
6. MT1-MMP está implicada en la migración endotelial y la formación de angiotubos *in vitro* inducidas por el NO.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ackah, E., Yu, J., Zoellner, S., Iwakiri, Y., Skurk, C., Shibata, R., Ouchi, N., Easton, R.M., Galasso, G., Birnbaum, M.J., Walsh, K., and Sessa, W.C. (2005). Akt1/protein kinase Balpha is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis. *The Journal of clinical investigation* 115, 2119-2127.
- Alfonso-Jaume, M.A., Mahimkar, R., and Lovett, D.H. (2004). Co-operative interactions between NFAT (nuclear factor of activated T cells) c1 and the zinc finger transcription factors Sp1/Sp3 and Egr-1 regulate MT1-MMP (membrane type 1 matrix metalloproteinase) transcription by glomerular mesangial cells. *The Biochemical journal* 380, 735-747.
- Anderson, H.D., Rahmutula, D., and Gardner, D.G. (2004). Tumor necrosis factor-alpha inhibits endothelial nitric-oxide synthase gene promoter activity in bovine aortic endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 279, 963-969.
- Anilkumar, N., Uekita, T., Couchman, J.R., Nagase, H., Seiki, M., and Itoh, Y. (2005). Palmitoylation at Cys574 is essential for MT1-MMP to promote cell migration. *Faseb J* 19, 1326-1328.
- Arnal, J.F., Yamin, J., Dockery, S., and Harrison, D.G. (1994). Regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA, protein, and activity during cell growth. *The American journal of physiology* 267, C1381-1388.
- Arriero, M.M., de La Pinta, J.C., Escribano, M., Celdran, A., Munoz-Alameda, L., Garcia-Canete, J., Jimenez, A.M., Casado, S., Farre, J., and Lopez-Farre, A. (2002). Aspirin prevents Escherichia coli lipopolysaccharide- and Staphylococcus aureus-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase expression in guinea pig pericardial tissue. *Circulation research* 90, 719-727.
- Arroyo, A.G., Sanchez-Mateos, P., Campanero, M.R., Martin-Padura, I., Dejana, E., and Sanchez-Madrid, F. (1992). Regulation of the VLA integrin-ligand interactions through the beta 1 subunit. *The Journal of cell biology* 117, 659-670.
- Artym, V.V., Zhang, Y., Seillier-Moiseiwitsch, F., Yamada, K.M., and Mueller, S.C. (2006). Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer research* 66, 3034-3043.
- Baker, A.H., Edwards, D.R., and Murphy, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of cell science* 115, 3719-3727.

Bartolome, R.A., Galvez, B.G., Longo, N., Baleux, F., Van Muijen, G.N., Sanchez-Mateos, P., Arroyo, A.G., and Teixido, J. (2004). Stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  promotes melanoma cell invasion across basement membranes involving stimulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and Rho GTPase activities. *Cancer research* 64, 2534-2543.

Bigg, H.F., Morrison, C.J., Butler, G.S., Bogoyevitch, M.A., Wang, Z., Soloway, P.D., and Overall, C.M. (2001). Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 inhibits but does not support the activation of gelatinase A via efficient inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *Cancer research* 61, 3610-3618.

Birkedal-Hansen, H. (1995). Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Current opinion in cell biology* 7, 728-735.

Bode, W., Grams, F., Reinemer, P., Gomis-Ruth, F.X., Baumann, U., McKay, D.B., and Stocker, W. (1996). The metzincin-superfamily of zinc-peptidases. *Adv Exp Med Biol* 389, 1-11.

Bove, P.F., Wesley, U.V., Greul, A.K., Hristova, M., Dostmann, W.R., and van der Vliet, A. (2007). Nitric oxide promotes airway epithelial wound repair through enhanced activation of MMP-9. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 36, 138-146.

Bravo-Cordero, J.J., Marrero-Diaz, R., Megias, D., Genis, L., Garcia-Grande, A., Garcia, M.A., Arroyo, A.G., and Montoya, M.C. (2007). MT1-MMP proinvasive activity is regulated by a novel Rab8-dependent exocytic pathway. *The EMBO journal* 26, 1499-1510.

Brooks, P.C., Stromblad, S., Sanders, L.C., von Schalscha, T.L., Aimes, R.T., Stetler-Stevenson, W.G., Quigley, J.P., and Cheresch, D.A. (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin  $\alpha$  v  $\beta$  3. *Cell* 85, 683-693.

Bulotta, S., Cerullo, A., Barsacchi, R., Palma, C.D., Rotiroti, D., Clementi, E., and Borgese, N. (2006). Endothelial nitric oxide synthase is segregated from caveolin-1 and localizes to the leading edge of migrating cells. *Experimental cell research* 312, 877-889.

Butt, E., Bernhardt, M., Smolenski, A., Kotsonis, P., Frohlich, L.G., Sickmann, A., Meyer, H.E., Lohmann, S.M., and Schmidt, H.H. (2000). Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *The Journal of biological chemistry* 275, 5179-5187.

Cao, S., Yao, J., McCabe, T.J., Yao, Q., Katusic, Z.S., Sessa, W.C., and Shah, V. (2001). Direct interaction between endothelial nitric-oxide synthase and dynamin-2. Implications for nitric-oxide synthase function. *The Journal of biological chemistry* 276, 14249-14256.

Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine* 9, 653-660.

- Carmeliet, P. (2005a). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932-936.
- Carmeliet, P. (2005b). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69 Suppl 3, 4-10.
- Cauwe, B., Steen, P.E., and Opdenakker, G. (2007). The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42, 113-185.
- Cavallaro, U., Liebner, S., and Dejana, E. (2006). Endothelial cadherins and tumor angiogenesis. *Experimental cell research* 312, 659-667.
- Chen, Z.P., Mitchelhill, K.I., Michell, B.J., Stapleton, D., Rodriguez-Crespo, I., Witters, L.A., Power, D.A., Ortiz de Montellano, P.R., and Kemp, B.E. (1999). AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS letters* 443, 285-289.
- Chun, T.H., Hotary, K.B., Sabeh, F., Saltiel, A.R., Allen, E.D., and Weiss, S.J. (2006). A pericellular collagenase directs the 3-dimensional development of white adipose tissue. *Cell* 125, 577-591.
- Chun, T.H., Sabeh, F., Ota, I., Murphy, H., McDonagh, K.T., Holmbeck, K., Birkedal-Hansen, H., Allen, E.D., and Weiss, S.J. (2004). MT1-MMP-dependent neovessel formation within the confines of the three-dimensional extracellular matrix. *The Journal of cell biology* 167, 757-767.
- Conner, S.D., and Schmid, S.L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37-44.
- Conrad, P.A., Smart, E.J., Ying, Y.S., Anderson, R.G., and Bloom, G.S. (1995). Caveolin cycles between plasma membrane caveolae and the Golgi complex by microtubule-dependent and microtubule-independent steps. *The Journal of cell biology* 131, 1421-1433.
- Cooke, J.P. (2000). Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 20, 2032-2037.
- Dedio, J., Konig, P., Wohlfart, P., Schroeder, C., Kummer, W., and Muller-Esterl, W. (2001). NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity. *Faseb J* 15, 79-89.
- Delany, A.M., Jeffrey, J.J., Rydziel, S., and Canalis, E. (1995). Cortisol increases interstitial collagenase expression in osteoblasts by post-transcriptional mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 270, 26607-26612.
- Deryugina, E.I., Ratnikov, B.I., Postnova, T.I., Rozanov, D.V., and Strongin, A.Y. (2002). Processing of integrin alpha(v) subunit by membrane type 1 matrix metalloproteinase stimulates migration of breast carcinoma cells on vitronectin and enhances tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase. *The Journal of biological chemistry* 277, 9749-9756.

Deshane, J., Chen, S., Caballero, S., Grochot-Przeczek, A., Was, H., Li Calzi, S., Lach, R., Hock, T.D., Chen, B., Hill-Kapturczak, N., Siegal, G.P., Dulak, J., Jozkowicz, A., Grant, M.B., and Agarwal, A. (2007). Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism. *J Exp Med* 204, 605-618.

Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., and Zeiher, A.M. (1999a). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601-605.

Dimmeler, S., Hermann, C., Galle, J., and Zeiher, A.M. (1999b). Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19, 656-664.

Du, X.L., Edelstein, D., Dimmeler, S., Ju, Q., Sui, C., and Brownlee, M. (2001). Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *The Journal of clinical investigation* 108, 1341-1348.

Dulak, J., Jozkowicz, A., Dembinska-Kiec, A., Guevara, I., Zdzenicka, A., Zmudzinska-Grochot, D., Florek, I., Wojtowicz, A., Szuba, A., and Cooke, J.P. (2000). Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 20, 659-666.

Dumont, O., Loufrani, L., and Henrion, D. (2007). Key role of the NO-pathway and matrix metalloprotease-9 in high blood flow-induced remodeling of rat resistance arteries. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 317-324.

Dusserre, N., L'Heureux, N., Bell, K.S., Stevens, H.Y., Yeh, J., Otte, L.A., Loufrani, L., and Frangos, J.A. (2004). PECAM-1 interacts with nitric oxide synthase in human endothelial cells: implication for flow-induced nitric oxide synthase activation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24, 1796-1802.

Endo, K., Takino, T., Miyamori, H., Kinsen, H., Yoshizaki, T., Furukawa, M., and Sato, H. (2003). Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. *The Journal of biological chemistry* 278, 40764-40770.

Endres, M., Laufs, U., Huang, Z., Nakamura, T., Huang, P., Moskowitz, M.A., and Liao, J.K. (1998). Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 8880-8885.

Esparza, J., Vilardell, C., Calvo, J., Juan, M., Vives, J., Urbano-Marquez, A., Yague, J., and Cid, M.C. (1999). Fibronectin upregulates gelatinase B (MMP-9) and induces coordinated expression of gelatinase A (MMP-2) and its activator MT1-MMP (MMP-14) by human T

lymphocyte cell lines. A process repressed through RAS/MAP kinase signaling pathways. *Blood* 94, 2754-2766.

Fernandez-Catalan, C., Bode, W., Huber, R., Turk, D., Calvete, J.J., Lichte, A., Tschesche, H., and Maskos, K. (1998). Crystal structure of the complex formed by the membrane type 1-matrix metalloproteinase with the tissue inhibitor of metalloproteinases-2, the soluble progelatinase A receptor. *The EMBO journal* 17, 5238-5248.

Fernandez-Hernando, C., Fukata, M., Bernatchez, P.N., Fukata, Y., Lin, M.I., Bredt, D.S., and Sessa, W.C. (2006). Identification of Golgi-localized acyl transferases that palmitoylate and regulate endothelial nitric oxide synthase. *The Journal of cell biology* 174, 369-377.

Feron, O., and Balligand, J.L. (2006). Caveolins and the regulation of endothelial nitric oxide synthase in the heart. *Cardiovascular research* 69, 788-797.

Feron, O., Dessy, C., Opel, D.J., Arstall, M.A., Kelly, R.A., and Michel, T. (1998). Modulation of the endothelial nitric-oxide synthase-caveolin interaction in cardiac myocytes. Implications for the autonomic regulation of heart rate. *The Journal of biological chemistry* 273, 30249-30254.

Filippov, S., Koenig, G.C., Chun, T.H., Hotary, K.B., Ota, I., Bugge, T.H., Roberts, J.D., Fay, W.P., Birkedal-Hansen, H., Holmbeck, K., Sabeh, F., Allen, E.D., and Weiss, S.J. (2005). MT1-matrix metalloproteinase directs arterial wall invasion and neointima formation by vascular smooth muscle cells. *J Exp Med* 202, 663-671.

Fleming, I., Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Kemp, B.E., and Busse, R. (2001). Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circulation research* 88, E68-75.

Forstermann, U., and Munzel, T. (2006). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113, 1708-1714.

Fowlkes, J.L., Enghild, J.J., Suzuki, K., and Nagase, H. (1994). Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *The Journal of biological chemistry* 269, 25742-25746.

Fowlkes, J.L., Thrailkill, K.M., Serra, D.M., Suzuki, K., and Nagase, H. (1995). Matrix metalloproteinases as insulin-like growth factor binding protein-degrading proteinases. *Progress in growth factor research* 6, 255-263.

Fulton, D., Babbitt, R., Zoellner, S., Fontana, J., Acevedo, L., McCabe, T.J., Iwakiri, Y., and Sessa, W.C. (2004). Targeting of endothelial nitric-oxide synthase to the cytoplasmic face of the Golgi complex or plasma membrane regulates Akt- versus calcium-dependent mechanisms for nitric oxide release. *The Journal of biological chemistry* 279, 30349-30357.

Fulton, D., Gratton, J.P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A., and Sessa, W.C. (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399, 597-601.

Furchgott, R.F. (1999). Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Bioscience reports* 19, 235-251.

Galvez, B.G., Genis, L., Matias-Roman, S., Oblander, S.A., Tryggvason, K., Apte, S.S., and Arroyo, A.G. (2005). Membrane type 1-matrix metalloproteinase is regulated by chemokines monocyte-chemoattractant protein-1/ccl2 and interleukin-8/CXCL8 in endothelial cells during angiogenesis. *The Journal of biological chemistry* 280, 1292-1298.

Galvez, B.G., Matias-Roman, S., Albar, J.P., Sanchez-Madrid, F., and Arroyo, A.G. (2001). Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling. *The Journal of biological chemistry* 276, 37491-37500.

Galvez, B.G., Matias-Roman, S., Yanez-Mo, M., Sanchez-Madrid, F., and Arroyo, A.G. (2002). ECM regulates MT1-MMP localization with beta1 or alphavbeta3 integrins at distinct cell compartments modulating its internalization and activity on human endothelial cells. *The Journal of cell biology* 159, 509-521.

Galvez, B.G., Matias-Roman, S., Yanez-Mo, M., Vicente-Manzanares, M., Sanchez-Madrid, F., and Arroyo, A.G. (2004). Caveolae are a novel pathway for membrane-type 1 matrix metalloproteinase traffic in human endothelial cells. *Molecular biology of the cell* 15, 678-687.

Garcia-Cardena, G., Fan, R., Stern, D.F., Liu, J., and Sessa, W.C. (1996). Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *The Journal of biological chemistry* 271, 27237-27240.

Gingras, D., Bousquet-Gagnon, N., Langlois, S., Lachambre, M.P., Annabi, B., and Beliveau, R. (2001). Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *FEBS letters* 507, 231-236.

Golser, R., Gorren, A.C., Leber, A., Andrew, P., Habisch, H.J., Werner, E.R., Schmidt, K., Venema, R.C., and Mayer, B. (2000). Interaction of endothelial and neuronal nitric-oxide synthases with the bradykinin B2 receptor. Binding of an inhibitory peptide to the oxygenase domain blocks uncoupled NADPH oxidation. *The Journal of biological chemistry* 275, 5291-5296.

Govers, R., Bevers, L., de Bree, P., and Rabelink, T.J. (2002). Endothelial nitric oxide synthase activity is linked to its presence at cell-cell contacts. *The Biochemical journal* 361, 193-201.



- Govers, R., and Rabelink, T.J. (2001). Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *American journal of physiology* 280, F193-206.
- Gross, J., and Lapiere, C.M. (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48, 1014-1022.
- Gu, Z., Kaul, M., Yan, B., Kridel, S.J., Cui, J., Strongin, A., Smith, J.W., Liddington, R.C., and Lipton, S.A. (2002). S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 297, 1186-1190.
- Haas, T.L., Stitelman, D., Davis, S.J., Apte, S.S., and Madri, J.A. (1999). Egr-1 mediates extracellular matrix-driven transcription of membrane type 1 matrix metalloproteinase in endothelium. *The Journal of biological chemistry* 274, 22679-22685.
- Han, Y.P., Tuan, T.L., Wu, H., Hughes, M., and Garner, W.L. (2001). TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. *Journal of cell science* 114, 131-139.
- Hess, A.R., Seftor, E.A., Seftor, R.E., and Hendrix, M.J. (2003). Phosphoinositide 3-kinase regulates membrane Type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry. *Cancer research* 63, 4757-4762.
- Hiraoka, N., Allen, E., Apel, I.J., Gyetko, M.R., and Weiss, S.J. (1998). Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* 95, 365-377.
- Holmbeck, K., Bianco, P., Caterina, J., Yamada, S., Kromer, M., Kuznetsov, S.A., Mankani, M., Robey, P.G., Poole, A.R., Pidoux, I., Ward, J.M., and Birkedal-Hansen, H. (1999). MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* 99, 81-92.
- Hood, J.D., Meininger, C.J., Ziche, M., and Granger, H.J. (1998). VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *The American journal of physiology* 274, H1054-1058.
- Hotary, K., Allen, E., Punturieri, A., Yana, I., and Weiss, S.J. (2000). Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *The Journal of cell biology* 149, 1309-1323.
- Hotary, K.B., Allen, E.D., Brooks, P.C., Datta, N.S., Long, M.W., and Weiss, S.J. (2003). Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. *Cell* 114, 33-45.

Huang, Y., Man, H.Y., Sekine-Aizawa, Y., Han, Y., Juluri, K., Luo, H., Cheah, J., Lowenstein, C., Haganir, R.L., and Snyder, S.H. (2005). S-nitrosylation of N-ethylmaleimide sensitive factor mediates surface expression of AMPA receptors. *Neuron* 46, 533-540.

Icking, A., Matt, S., Opitz, N., Wiesenthal, A., Muller-Esterl, W., and Schilling, K. (2005). NOSTRIN functions as a homotrimeric adaptor protein facilitating internalization of eNOS. *Journal of cell science* 118, 5059-5069.

Ignarro, L.J., Byrns, R.E., Buga, G.M., Wood, K.S., and Chaudhuri, G. (1988). Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 244, 181-189.

Imai, K., Hiramatsu, A., Fukushima, D., Pierschbacher, M.D., and Okada, Y. (1997). Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *The Biochemical journal* 322 ( Pt 3), 809-814.

Inoue, N., Venema, R.C., Sayegh, H.S., Ohara, Y., Murphy, T.J., and Harrison, D.G. (1995). Molecular regulation of the bovine endothelial cell nitric oxide synthase by transforming growth factor-beta 1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 15, 1255-1261.

Isshiki, M., Ando, J., Korenaga, R., Kogo, H., Fujimoto, T., Fujita, T., and Kamiya, A. (1998). Endothelial Ca<sup>2+</sup> waves preferentially originate at specific loci in caveolin-rich cell edges. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 5009-5014.

Itoh, Y. (2006). MT1-MMP: a key regulator of cell migration in tissue. *IUBMB Life* 58, 589-596.

Itoh, Y., Kajita, M., Kinoh, H., Mori, H., Okada, A., and Seiki, M. (1999). Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase. *The Journal of biological chemistry* 274, 34260-34266.

Itoh, Y., and Seiki, M. (2006). MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. *Journal of cellular physiology* 206, 1-8.

Itoh, Y., Takamura, A., Ito, N., Maru, Y., Sato, H., Suenaga, N., Aoki, T., and Seiki, M. (2001). Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *The EMBO journal* 20, 4782-4793.

Jiang, A., Lehti, K., Wang, X., Weiss, S.J., Keski-Oja, J., and Pei, D. (2001). Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 13693-13698.

Jimenez, M.J., Balbin, M., Alvarez, J., Komori, T., Bianco, P., Holmbeck, K., Birkedal-Hansen, H., Lopez, J.M., and Lopez-Otin, C. (2001). A regulatory cascade involving retinoic acid, Cbfa1, and matrix metalloproteinases is coupled to the development of a process of perichondrial invasion and osteogenic differentiation during bone formation. *The Journal of cell biology* 155, 1333-1344.

Kajita, M., Itoh, Y., Chiba, T., Mori, H., Okada, A., Kinoh, H., and Seiki, M. (2001). Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *The Journal of cell biology* 153, 893-904.

Kinoshita, T., Fukuzawa, H., Shimada, T., Saito, T., and Matsuda, Y. (1992). Primary structure and expression of a gamete lytic enzyme in *Chlamydomonas reinhardtii*: similarity of functional domains to matrix metalloproteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 4693-4697.

Knauper, V., Bailey, L., Worley, J.R., Soloway, P., Patterson, M.L., and Murphy, G. (2002). Cellular activation of proMMP-13 by MT1-MMP depends on the C-terminal domain of MMP-13. *FEBS letters* 532, 127-130.

Kojima, S., Itoh, Y., Matsumoto, S., Masuho, Y., and Seiki, M. (2000). Membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MT6-MMP, MMP-25) is the second glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI)-anchored MMP. *FEBS letters* 480, 142-146.

Kondo, T., Kobayashi, K., and Murohara, T. (2004). Nitric oxide signaling during myocardial angiogenesis. *Mol Cell Biochem* 264, 25-34.

Koshikawa, N., Giannelli, G., Cirulli, V., Miyazaki, K., and Quaranta, V. (2000). Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *The Journal of cell biology* 148, 615-624.

Labrecque, L., Nyalendo, C., Langlois, S., Durocher, Y., Roghi, C., Murphy, G., Gingras, D., and Beliveau, R. (2004). Src-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 induces its association with membrane type 1 matrix metalloproteinase. *The Journal of biological chemistry* 279, 52132-52140.

Lander, H.M., Milbank, A.J., Tauras, J.M., Hajjar, D.P., Hempstead, B.L., Schwartz, G.D., Kraemer, R.T., Mirza, U.A., Chait, B.T., Burk, S.C., and Quilliam, L.A. (1996). Redox regulation of cell signalling. *Nature* 381, 380-381.

Langlois, S., Gingras, D., and Beliveau, R. (2004). Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cooperates with sphingosine 1-phosphate to induce endothelial cell migration and morphogenic differentiation. *Blood* 103, 3020-3028.

Lee, P.C., Kibbe, M.R., Schuchert, M.J., Stolz, D.B., Watkins, S.C., Griffith, B.P., Billiar, T.R., and Shears, L.L., 2nd. (2000). Nitric oxide induces angiogenesis and upregulates alpha(v)beta(3) integrin expression on endothelial cells. *Microvasc Res* 60, 269-280.

Lee, P.C., Salyapongse, A.N., Bragdon, G.A., Shears, L.L., 2nd, Watkins, S.C., Edington, H.D., and Billiar, T.R. (1999). Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *The American journal of physiology* 277, H1600-1608.

Lehti, K., Allen, E., Birkedal-Hansen, H., Holmbeck, K., Miyake, Y., Chun, T.H., and Weiss, S.J. (2005). An MT1-MMP-PDGF receptor-beta axis regulates mural cell investment of the microvasculature. *Genes Dev* 19, 979-991.

Lehti, K., Lohi, J., Juntunen, M.M., Pei, D., and Keski-Oja, J. (2002). Oligomerization through hemopexin and cytoplasmic domains regulates the activity and turnover of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *The Journal of biological chemistry* 277, 8440-8448.

Lehti, K., Valtanen, H., Wickstrom, S.A., Lohi, J., and Keski-Oja, J. (2000). Regulation of membrane-type-1 matrix metalloproteinase activity by its cytoplasmic domain. *The Journal of biological chemistry* 275, 15006-15013.

Leontovich, A.A., Zhang, J., Shimokawa, K., Nagase, H., and Sarras, M.P., Jr. (2000). A novel hydra matrix metalloproteinase (HMMP) functions in extracellular matrix degradation, morphogenesis and the maintenance of differentiated cells in the foot process. *Development (Cambridge, England)* 127, 907-920.

Lepage, T., and Gache, C. (1990). Early expression of a collagenase-like hatching enzyme gene in the sea urchin embryo. *The EMBO journal* 9, 3003-3012.

Li, W., Mital, S., Ojaimi, C., Csiszar, A., Kaley, G., and Hintze, T.H. (2004). Premature death and age-related cardiac dysfunction in male eNOS-knockout mice. *J Mol Cell Cardiol* 37, 671-680.

Liu, J., Hughes, T.E., and Sessa, W.C. (1997). The first 35 amino acids and fatty acylation sites determine the molecular targeting of endothelial nitric oxide synthase into the Golgi region of cells: a green fluorescent protein study. *The Journal of cell biology* 137, 1525-1535.

Llano, E., Pendas, A.M., Aza-Blanc, P., Kornberg, T.B., and Lopez-Otin, C. (2000). Dm1-MMP, a matrix metalloproteinase from *Drosophila* with a potential role in extracellular matrix remodeling during neural development. *The Journal of biological chemistry* 275, 35978-35985.

- Lohi, J., Lehti, K., Valtanen, H., Parks, W.C., and Keski-Oja, J. (2000). Structural analysis and promoter characterization of the human membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) gene. *Gene* 242, 75-86.
- Lopez-Ongil, S., Saura, M., Rodriguez-Puyol, D., Rodriguez-Puyol, M., and Lamas, S. (1996). Regulation of endothelial NO synthase expression by cyclosporin A in bovine aortic endothelial cells. *The American journal of physiology* 271, H1072-1078.
- Lopez-Rivera, E., Lizarbe, T.R., Martinez-Moreno, M., Lopez-Novoa, J.M., Rodriguez-Barbero, A., Rodrigo, J., Fernandez, A.P., Alvarez-Barrientos, A., Lamas, S., and Zaragoza, C. (2005). Matrix metalloproteinase 13 mediates nitric oxide activation of endothelial cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 3685-3690.
- Lowenstein, C.J. (2007). Nitric oxide regulation of protein trafficking in the cardiovascular system. *Cardiovascular research* 75, 240-246.
- Lukashev, M.E., and Werb, Z. (1998). ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends in cell biology* 8, 437-441.
- Manabe, S., Gu, Z., and Lipton, S.A. (2005). Activation of matrix metalloproteinase-9 via neuronal nitric oxide synthase contributes to NMDA-induced retinal ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 4747-4753.
- Manes, S., Mira, E., Barbacid, M.M., Cipres, A., Fernandez-Resa, P., Buesa, J.M., Merida, I., Aracil, M., Marquez, G., and Martinez, A.C. (1997). Identification of insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3. *The Journal of biological chemistry* 272, 25706-25712.
- Maniatis, N.A., Brovkovich, V., Allen, S.E., John, T.A., Shajahan, A.N., Tirupathi, C., Vogel, S.M., Skidgel, R.A., Malik, A.B., and Minshall, R.D. (2006). Novel mechanism of endothelial nitric oxide synthase activation mediated by caveolae internalization in endothelial cells. *Circulation research* 99, 870-877.
- Marcet-Palacios, M., Graham, K., Cass, C., Befus, A.D., Mayers, I., and Radomski, M.W. (2003). Nitric oxide and cyclic GMP increase the expression of matrix metalloproteinase-9 in vascular smooth muscle. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 307, 429-436.
- Marrero, M.B., Venema, V.J., Ju, H., He, H., Liang, H., Caldwell, R.B., and Venema, R.C. (1999). Endothelial nitric oxide synthase interactions with G-protein-coupled receptors. *The Biochemical journal* 343 Pt 2, 335-340.

McCawley, L.J., and Matrisian, L.M. (2000). Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Molecular medicine today* 6, 149-156.

McCawley, L.J., and Matrisian, L.M. (2001). Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Current opinion in cell biology* 13, 534-540.

McGeehan, G., Burkhart, W., Anderegg, R., Becherer, J.D., Gillikin, J.W., and Graham, J.S. (1992). Sequencing and Characterization of the Soybean Leaf Metalloproteinase : Structural and Functional Similarity to the Matrix Metalloproteinase Family. *Plant Physiol* 99, 1179-1183.

Meffert, M.K., Calakos, N.C., Scheller, R.H., and Schulman, H. (1996). Nitric oxide modulates synaptic vesicle docking fusion reactions. *Neuron* 16, 1229-1236.

Mellman, I., and Warren, G. (2000). The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* 100, 99-112.

Michell, B.J., Chen, Z., Tiganis, T., Stapleton, D., Katsis, F., Power, D.A., Sim, A.T., and Kemp, B.E. (2001). Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry* 276, 17625-17628.

Michell, B.J., Harris, M.B., Chen, Z.P., Ju, H., Venema, V.J., Blackstone, M.A., Huang, W., Venema, R.C., and Kemp, B.E. (2002). Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635. *The Journal of biological chemistry* 277, 42344-42351.

Miki, T., Takegami, Y., Okawa, K., Muraguchi, T., Noda, M., and Takahashi, C. (2007). The reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase N and modulates their endocytic pathways. *The Journal of biological chemistry* 282, 12341-12352.

Moncada, S., and Higgs, E.A. (2006). Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol*, 213-254.

Morbidelli, L., Chang, C.H., Douglas, J.G., Granger, H.J., Ledda, F., and Ziche, M. (1996). Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *The American journal of physiology* 270, H411-415.

Morbidelli, L., Donnini, S., and Ziche, M. (2003). Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis. *Curr Pharm Des* 9, 521-530.

Mori, H., Tomari, T., Koshikawa, N., Kajita, M., Itoh, Y., Sato, H., Tojo, H., Yana, I., and Seiki, M. (2002). CD44 directs membrane-type 1 matrix metalloproteinase to lamellipodia by associating with its hemopexin-like domain. *The EMBO journal* 21, 3949-3959.

Mott, J.D., Thomas, C.L., Rosenbach, M.T., Takahara, K., Greenspan, D.S., and Banda, M.J. (2000). Post-translational proteolytic processing of procollagen C-terminal proteinase enhancer releases a metalloproteinase inhibitor. *The Journal of biological chemistry* 275, 1384-1390.

Murohara, T., Asahara, T., Silver, M., Bauters, C., Masuda, H., Kalka, C., Kearney, M., Chen, D., Symes, J.F., Fishman, M.C., Huang, P.L., and Isner, J.M. (1998a). Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *The Journal of clinical investigation* 101, 2567-2578.

Murohara, T., Horowitz, J.R., Silver, M., Tsurumi, Y., Chen, D., Sullivan, A., and Isner, J.M. (1998b). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 97, 99-107.

Murohara, T., Witzenbichler, B., Spyridopoulos, I., Asahara, T., Ding, B., Sullivan, A., Losordo, D.W., and Isner, J.M. (1999). Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19, 1156-1161.

Murphy, G., Allan, J.A., Willenbrock, F., Cockett, M.I., O'Connell, J.P., and Docherty, A.J. (1992). The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity. *The Journal of biological chemistry* 267, 9612-9618.

Murphy, P.R., Limoges, M., Dodd, F., Boudreau, R.T., and Too, C.K. (2001). Fibroblast growth factor-2 stimulates endothelial nitric oxide synthase expression and inhibits apoptosis by a nitric oxide-dependent pathway in Nb2 lymphoma cells. *Endocrinology* 142, 81-88.

Nagase, H., and Woessner, J.F., Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. *The Journal of biological chemistry* 274, 21491-21494.

Nakada, M., Yamada, A., Takino, T., Miyamori, H., Takahashi, T., Yamashita, J., and Sato, H. (2001). Suppression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MMP)-mediated MMP-2 activation and tumor invasion by testican 3 and its splicing variant gene product, N-Tes. *Cancer research* 61, 8896-8902.

Nakahara, H., Howard, L., Thompson, E.W., Sato, H., Seiki, M., Yeh, Y., and Chen, W.T. (1997). Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 7959-7964.

Naor, D., Sionov, R.V., and Ish-Shalom, D. (1997). CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Advances in cancer research* 71, 241-319.

Noiri, E., Lee, E., Testa, J., Quigley, J., Colflesh, D., Keese, C.R., Giaever, I., and Goligorsky, M.S. (1998). Podokinesis in endothelial cell migration: role of nitric oxide. *The American journal of physiology* 274, C236-244.

Nyalendo, C., Michaud, M., Beaulieu, E., Roghi, C., Murphy, G., Gingras, D., and Beliveau, R. (2007). Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration. *The Journal of biological chemistry* 282, 15690-15699.

Oblander, S.A., Zhou, Z., Galvez, B.G., Starcher, B., Shannon, J.M., Durbeej, M., Arroyo, A.G., Tryggvason, K., and Apte, S.S. (2005). Distinctive functions of membrane type 1 matrix-metalloprotease (MT1-MMP or MMP-14) in lung and submandibular gland development are independent of its role in pro-MMP-2 activation. *Dev Biol* 277, 255-269.

Oh, J., Takahashi, R., Kondo, S., Mizoguchi, A., Adachi, E., Sasahara, R.M., Nishimura, S., Imamura, Y., Kitayama, H., Alexander, D.B., Ide, C., Horan, T.P., Arakawa, T., Yoshida, H., Nishikawa, S., Itoh, Y., Seiki, M., Itohar, S., Takahashi, C., and Noda, M. (2001). The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* 107, 789-800.

Okumura, Y., Sato, H., Seiki, M., and Kido, H. (1997). Proteolytic activation of the precursor of membrane type 1 matrix metalloproteinase by human plasmin. A possible cell surface activator. *FEBS letters* 402, 181-184.

Osenkowski, P., Toth, M., and Fridman, R. (2004). Processing, shedding, and endocytosis of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *Journal of cellular physiology* 200, 2-10.

Overall, C.M. (2001). Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules and exosites. Overview and experimental strategies. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J) 151, 79-120.

Overall, C.M., Wrana, J.L., and Sodek, J. (1991). Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *The Journal of biological chemistry* 266, 14064-14071.

Page-McCaw, A., Ewald, A.J., and Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 221-233.

Palmer, R.M., Ashton, D.S., and Moncada, S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333, 664-666.

Palmer, R.M., Ferrige, A.G., and Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526.

Park, M.J., Park, I.C., Hur, J.H., Rhee, C.H., Choe, T.B., Yi, D.H., Hong, S.I., and Lee, S.H. (2000). Protein kinase C activation by phorbol ester increases in vitro invasion through



regulation of matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases system in D54 human glioblastoma cells. *Neuroscience letters* 290, 201-204.

Parton, R.G., Joggerst, B., and Simons, K. (1994). Regulated internalization of caveolae. *The Journal of cell biology* 127, 1199-1215.

Pei, D., and Weiss, S.J. (1995). Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 375, 244-247.

Poppa, V., Miyashiro, J.K., Corson, M.A., and Berk, B.C. (1998). Endothelial NO synthase is increased in regenerating endothelium after denuding injury of the rat aorta. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 18, 1312-1321.

Predescu, D., Predescu, S., Shimizu, J., Miyawaki-Shimizu, K., and Malik, A.B. (2005). Constitutive eNOS-derived nitric oxide is a determinant of endothelial junctional integrity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289, L371-381.

Price, L.S., Leng, J., Schwartz, M.A., and Bokoch, G.M. (1998). Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Molecular biology of the cell* 9, 1863-1871.

Pyriochou, A., Beis, D., Koika, V., Potytarchou, C., Papadimitriou, E., Zhou, Z., and Papapetropoulos, A. (2006). Soluble guanylyl cyclase activation promotes angiogenesis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 319, 663-671.

Radomski, M.W., Palmer, R.M., and Moncada, S. (1987). The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *British journal of pharmacology* 92, 639-646.

Raines, K.W., Bonini, M.G., and Campbell, S.L. (2007). Nitric oxide cell signaling: S-nitrosation of Ras superfamily GTPases. *Cardiovascular research* 75, 229-239.

Rajagopalan, S., Meng, X.P., Ramasamy, S., Harrison, D.G., and Galis, Z.S. (1996). Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *The Journal of clinical investigation* 98, 2572-2579.

Ratnikov, B.I., Deryugina, E.I., and Strongin, A.Y. (2002). Gelatin zymography and substrate cleavage assays of matrix metalloproteinase-2 in breast carcinoma cells overexpressing membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 82, 1583-1590.

Remacle, A., Murphy, G., and Roghi, C. (2003). Membrane type I-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface. *Journal of cell science* 116, 3905-3916.

Remacle, A.G., Chekanov, A.V., Golubkov, V.S., Savinov, A.Y., Rozanov, D.V., and Strongin, A.Y. (2006). O-glycosylation regulates autolysis of cellular membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *The Journal of biological chemistry* 281, 16897-16905.

Ren, M., Zeng, J., De Lemos-Chiarandini, C., Rosenfeld, M., Adesnik, M., and Sabatini, D.D. (1996). In its active form, the GTP-binding protein rab8 interacts with a stress-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 5151-5155.

Rikitake, Y., Hirata, K., Kawashima, S., Ozaki, M., Takahashi, T., Ogawa, W., Inoue, N., and Yokoyama, M. (2002). Involvement of endothelial nitric oxide in sphingosine-1-phosphate-induced angiogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 22, 108-114.

Rozanov, D.V., Deryugina, E.I., Ratnikov, B.I., Monosov, E.Z., Marchenko, G.N., Quigley, J.P., and Strongin, A.Y. (2001). Mutation analysis of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). The role of the cytoplasmic tail Cys(574), the active site Glu(240), and furin cleavage motifs in oligomerization, processing, and self-proteolysis of MT1-MMP expressed in breast carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry* 276, 25705-25714.

Sabeh, F., Ota, I., Holmbeck, K., Birkedal-Hansen, H., Soloway, P., Balbin, M., Lopez-Otin, C., Shapiro, S., Inada, M., Krane, S., Allen, E., Chung, D., and Weiss, S.J. (2004). Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *The Journal of cell biology* 167, 769-781.

Sanchez-Lopez, R., Alexander, C.M., Behrendtsen, O., Breathnach, R., and Werb, Z. (1993). Role of zinc-binding- and hemopexin domain-encoded sequences in the substrate specificity of collagenase and stromelysin-2 as revealed by chimeric proteins. *The Journal of biological chemistry* 268, 7238-7247.

Sato, H., Kinoshita, T., Takino, T., Nakayama, K., and Seiki, M. (1996). Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. *FEBS letters* 393, 101-104.

Sato, H., Takino, T., and Miyamori, H. (2005). Roles of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis. *Cancer science* 96, 212-217.

Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E., and Seiki, M. (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370, 61-65.

Sato, T., del Carmen Ovejero, M., Hou, P., Heegaard, A.M., Kumegawa, M., Foged, N.T., and Delaisse, J.M. (1997). Identification of the membrane-type matrix metalloproteinase MT1-MMP in osteoclasts. *Journal of cell science* 110 ( Pt 5), 589-596.

Schilling, K., Opitz, N., Wiesenthal, A., Oess, S., Tikkanen, R., Muller-Esterl, W., and Icking, A. (2006). Translocation of endothelial nitric-oxide synthase involves a ternary complex with caveolin-1 and NOSTRIN. *Molecular biology of the cell* 17, 3870-3880.

Shaul, P.W., Smart, E.J., Robinson, L.J., German, Z., Yuhanna, I.S., Ying, Y., Anderson, R.G., and Michel, T. (1996). Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *The Journal of biological chemistry* 271, 6518-6522.

Shipley, J.M., Doyle, G.A., Fliszar, C.J., Ye, Q.Z., Johnson, L.L., Shapiro, S.D., Welgus, H.G., and Senior, R.M. (1996). The structural basis for the elastolytic activity of the 92-kDa and 72-kDa gelatinases. Role of the fibronectin type II-like repeats. *The Journal of biological chemistry* 271, 4335-4341.

Shofuda, K.I., Hasenstab, D., Kenagy, R.D., Shofuda, T., Li, Z.Y., Lieber, A., and Clowes, A.W. (2001). Membrane-type matrix metalloproteinase-1 and -3 activity in primate smooth muscle cells. *Faseb J* 15, 2010-2012.

Somerville, R.P., Oblander, S.A., and Apte, S.S. (2003). Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol* 4, 216.

Sounni, N.E., Janssen, M., Foidart, J.M., and Noel, A. (2003). Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis. *Matrix Biol* 22, 55-61.

Sounni, N.E., Roghi, C., Chabottaux, V., Janssen, M., Munaut, C., Maquoi, E., Galvez, B.G., Gilles, C., Frankenre, F., Murphy, G., Foidart, J.M., and Noel, A. (2004). Up-regulation of vascular endothelial growth factor-A by active membrane-type 1 matrix metalloproteinase through activation of Src-tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry* 279, 13564-13574.

Stahlhut, M., and van Deurs, B. (2000). Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Molecular biology of the cell* 11, 325-337.

Stamenkovic, I. (2003). Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 200, 448-464.

Sternlicht, M.D., Lochter, A., Simpson, C.J., Huey, B., Rougier, J.P., Gray, J.W., Pinkel, D., Bissell, M.J., and Werb, Z. (1999). The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 98, 137-146.

Sternlicht, M.D., and Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual review of cell and developmental biology* 17, 463-516.

Stocker, W., and Bode, W. (1995). Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Current opinion in structural biology* 5, 383-390.

Strongin, A.Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B.L., Grant, G.A., and Goldberg, G.I. (1995). Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *The Journal of biological chemistry* 270, 5331-5338.

Suenaga, N., Mori, H., Itoh, Y., and Seiki, M. (2005). CD44 binding through the hemopexin-like domain is critical for its shedding by membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Oncogene* 24, 859-868.

Takino, T., Miyamori, H., Kawaguchi, N., Uekita, T., Seiki, M., and Sato, H. (2003). Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Biochemical and biophysical research communications* 304, 160-166.

Takino, T., Miyamori, H., Watanabe, Y., Yoshioka, K., Seiki, M., and Sato, H. (2004). Membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates collagen-dependent mitogen-activated protein/extracellular signal-related kinase activation and cell migration. *Cancer research* 64, 1044-1049.

Taniwaki, K., Fukamachi, H., Komori, K., Ohtake, Y., Nonaka, T., Sakamoto, T., Shiomi, T., Okada, Y., Itoh, T., Itohara, S., Seiki, M., and Yana, I. (2007). Stroma-derived matrix metalloproteinase (MMP)-2 promotes membrane type 1-MMP-dependent tumor growth in mice. *Cancer research* 67, 4311-4319.

Toth, M., Hernandez-Barrantes, S., Osenkowski, P., Bernardo, M.M., Gervasi, D.C., Shimura, Y., Meroueh, O., Kotra, L.P., Galvez, B.G., Arroyo, A.G., Mobashery, S., and Fridman, R. (2002). Complex pattern of membrane type 1 matrix metalloproteinase shedding. Regulation by autocatalytic cells surface inactivation of active enzyme. *The Journal of biological chemistry* 277, 26340-26350.

Toth, M., Sohail, A., Mobashery, S., and Fridman, R. (2006). MT1-MMP shedding involves an ADAM and is independent of its localization in lipid rafts. *Biochemical and biophysical research communications* 350, 377-384.

Tsunezuka, Y., Kinoh, H., Takino, T., Watanabe, Y., Okada, Y., Shinagawa, A., Sato, H., and Seiki, M. (1996). Expression of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) in tumor cells enhances pulmonary metastasis in an experimental metastasis assay. *Cancer research* 56, 5678-5683.

Ueda, J., Kajita, M., Suenaga, N., Fujii, K., and Seiki, M. (2003). Sequence-specific silencing of MT1-MMP expression suppresses tumor cell migration and invasion: importance of MT1-MMP as a therapeutic target for invasive tumors. *Oncogene* 22, 8716-8722.

Uekita, T., Gotoh, I., Kinoshita, T., Itoh, Y., Sato, H., Shiomi, T., Okada, Y., and Seiki, M. (2004). Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cytoplasmic tail-binding protein-1 is a new

member of the Cupin superfamily. A possible multifunctional protein acting as an invasion suppressor down-regulated in tumors. *The Journal of biological chemistry* 279, 12734-12743.

Uekita, T., Itoh, Y., Yana, I., Ohno, H., and Seiki, M. (2001). Cytoplasmic tail-dependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for its invasion-promoting activity. *The Journal of cell biology* 155, 1345-1356.

Venema, R.C. (2002). Post-translational mechanisms of endothelial nitric oxide synthase regulation by bradykinin. *Int Immunopharmacol* 2, 1755-1762.

Venema, R.C., Sayegh, H.S., Arnal, J.F., and Harrison, D.G. (1995). Role of the enzyme calmodulin-binding domain in membrane association and phospholipid inhibition of endothelial nitric oxide synthase. *The Journal of biological chemistry* 270, 14705-14711.

Verbeuren, T.J., Jordaens, F.H., Zonnekeyn, L.L., Van Hove, C.E., Coene, M.C., and Herman, A.G. (1986). Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. I. Endothelium-dependent and endothelium-independent contractions and relaxations in isolated arteries of control and hypercholesterolemic rabbits. *Circulation research* 58, 552-564.

Wang, G., Moniri, N.H., Ozawa, K., Stamler, J.S., and Daaka, Y. (2006). Nitric oxide regulates endocytosis by S-nitrosylation of dynamin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 1295-1300.

Wang, X., Ma, D., Keski-Oja, J., and Pei, D. (2004). Co-recycling of MT1-MMP and MT3-MMP through the trans-Golgi network. Identification of DKV582 as a recycling signal. *The Journal of biological chemistry* 279, 9331-9336.

Werb, Z. (1997). ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 91, 439-442.

Westermarck, J., and Kahari, V.M. (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *Faseb J* 13, 781-792.

Whitelock, J.M., Murdoch, A.D., Iozzo, R.V., and Underwood, P.A. (1996). The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *The Journal of biological chemistry* 271, 10079-10086.

Wu, Y.I., Munshi, H.G., Sen, R., Snipas, S.J., Salvesen, G.S., Fridman, R., and Stack, M.S. (2004). Glycosylation broadens the substrate profile of membrane type 1 matrix metalloproteinase. *The Journal of biological chemistry* 279, 8278-8289.

Yana, I., and Seiki, M. (2002). MT-MMPs play pivotal roles in cancer dissemination. *Clinical & experimental metastasis* 19, 209-215.

Yanez-Mo, M., Alfranca, A., Cabanas, C., Marazuela, M., Tejedor, R., Ursa, M.A., Ashman, L.K., de Landazuri, M.O., and Sanchez-Madrid, F. (1998). Regulation of endothelial cell motility by complexes of tetraspan molecules CD81/TAPA-1 and CD151/PETA-3 with  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin localized at endothelial lateral junctions. *The Journal of cell biology* 141, 791-804.

Yoshizumi, M., Perrella, M.A., Burnett, J.C., Jr., and Lee, M.E. (1993). Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circulation research* 73, 205-209.

Zaragoza, C., Soria, E., Lopez, E., Browning, D., Balbin, M., Lopez-Otin, C., and Lamas, S. (2002). Activation of the mitogen activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 by the nitric oxide-cGMP-cGMP-dependent protein kinase axis regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in vascular endothelial cells. *Mol Pharmacol* 62, 927-935.

Zembowicz, A., Tang, J.L., and Wu, K.K. (1995). Transcriptional induction of endothelial nitric oxide synthase type III by lysophosphatidylcholine. *The Journal of biological chemistry* 270, 17006-17010.

Zhang, J., Sarkar, S., and Yong, V.W. (2005). The chemokine stromal cell derived factor-1 (CXCL12) promotes glioma invasiveness through MT2-matrix metalloproteinase. *Carcinogenesis* 26, 2069-2077.

Zhao, X., Lu, X., and Feng, Q. (2002). Deficiency in endothelial nitric oxide synthase impairs myocardial angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H2371-2378.

Zhou, Z., Apte, S.S., Soininen, R., Cao, R., Baaklini, G.Y., Rauser, R.W., Wang, J., Cao, Y., and Tryggvason, K. (2000). Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 4052-4057.

Zhuge, Y., and Xu, J. (2001). Rac1 mediates type I collagen-dependent MMP-2 activation. role in cell invasion across collagen barrier. *The Journal of biological chemistry* 276, 16248-16256.

Ziche, M., Morbidelli, L., Masini, E., Amerini, S., Granger, H.J., Maggi, C.A., Geppetti, P., and Ledda, F. (1994). Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *The Journal of clinical investigation* 94, 2036-2044.

Ziche, M., Parenti, A., Ledda, F., Dell'Era, P., Granger, H.J., Maggi, C.A., and Presta, M. (1997). Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bFGF. *Circulation research* 80, 845-852.

Zimmermann, K., Opitz, N., Dedio, J., Renne, C., Muller-Esterl, W., and Oess, S. (2002). NOSTRIN: a protein modulating nitric oxide release and subcellular distribution of endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 17167-17172.

## LISTA DE PUBLICACIONES

1. B.G. Gálvez, **L. Genís**, S. Matías-Román, S.A. Oblander, K. Tryggvason, S.S. Apte, and A.G. Arroyo. Membrane type 1-matrix metalloproteinase Is Regulated by Chemokines Monocyte-Chemoattractant Protein-1/CCL2 and Interleukin8/CXCL8 in Endothelial Cells during Angiogenesis. 2005. J. Biol.Chem. 280:1292- 1298
2. S. Matías-Roman, B. G. Gálvez, **L. Genís**, M. Yáñez-Mó, G. de la Rosa, P. Sánchez- Mateos, F. Sánchez- Madrid, and A. G. Arroyo. Membrane type 1-matrix metalloproteinase is involved in migration of human monocytes and is regulated through their interaction with fibronectin or endothelium. 2005. Blood. 105(10):3956-64. Erratum in: Blood. 2006. 107(6):2586.
3. **L. Genís**, P. Gonzalo, A.G. Arroyo. MT1-MMP: universal or particular player in angiogenesis? 2007. Cancer Metastasis Rev. 25 (1):77-86. Review.
4. J.J. Bravo-Cordero, R. Marrero-Díaz, D. Megías, **L. Genís**, A. García-Grande, M. A. García, A. G. Arroyo, M.C. Montoya. MT1-MMP proinvasive activity is regulated by a novel Rab8-dependent exocytic pathway. 2007. EMBO J. 26 (6):1499-510
5. A.G. Arroyo, **L. Genís**, P. Gonzalo, S. Matías-Román, A. Pollán, and B.G. Gálvez. Matrix metalloproteinases (MMPs): new routes to the use of MT1-MMP as a therapeutic target in angiogenesis-related disease. 2007. Curr Pharm Des. 13(17):1787-802. Review.
6. **L. Genís**, P. Gonzalo, A. S. Tutor , B.G. Gálvez, A. Martínez-Ruiz, C. Zaragoza, S. Lamas, K. Tryggvason, S.S. Apte, and A. G. Arroyo. 2007. Functional interplay between endothelial nitric oxide synthase and membrane type 1-matrix metalloproteinase in migrating endothelial cells. 2007. Jul 2. Blood. (*Epub ahead of print*).
7. M. Yáñez-Mó, O. Barreiro, P. Gonzalo, A. Batista, D. Megías, **L. Genís**, N. Sachs, M. Sala-Valdés, M. A. Alonso, M. C. Montoya, A. Sonnenberg, A. G. Arroyo, and F. Sánchez-Madrid. MT1-MMP proteolytic activity is regulated through association with tetraspanin CD151 at endothelial junctions. 2007. (*submitted*).
8. P. Gonzalo, A. Pollán, A. S. Tutor, **L. Genís**, R. A. Bartolomé, A. Vasanji, J.Wylie, K. Tryggvason, J. Teixidó, K. Mikecz, J. Risteli, S. S. Apte, and A. G. Arroyo. Membrane type 1-matrix metalloproteinase is necessary for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. 2007. (*submitted*).
9. A. Alfranca, J. M. López, **L. Genís**, D. López-Maderuelo, D. Salvado, A. J. Quesada, A. G. Arroyo, and J. M. Redondo. 2007. PGE2 induces angiogenesis via the MT1-MMP-mediated activation of the TGF $\beta$ /ALK5 signaling pathway. (*submitted*)



## **ANEXOS**